

DIE WIRKUNG VON ALDOSTERON AUF DEN TRANSEPITHELIALEN NATRIUMTRANSPORT
DER KRÖTENHARNBLASE

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Gertrud Spancken
aus
Menden

München, März 1987



DIE WIRKUNG VON ALDOSTERON AUF DEN TRANSEPITHELIALEN NATRIUMTRANSPORT
DER KRÖTENHARNBLASE

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Gertrud Spancken
aus
Menden

München, März 1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1.1	Einleitung	1
1.2	Ziele und Aufgabenstellung	2
1.3	Methodik	3
1.4	Ergebnisse	4
1.5	Fazit	5
2.1	Grundlagen der Mechanik	6
2.2	Statik	7
2.3	Dynamik	8
2.4	Strömungsmechanik	9
2.5	Wärmeübertragung	10
2.6	Elektrotechnik	11
2.7	Materialkunde	12
2.8	Maßstab und Zeichnung	13
2.9	Prüfungsausschuss	14
2.10	Prüfungsausschuss	15
2.11	Prüfungsausschuss	16
2.12	Prüfungsausschuss	17
2.13	Prüfungsausschuss	18
2.14	Prüfungsausschuss	19
2.15	Prüfungsausschuss	20
2.16	Prüfungsausschuss	21
2.17	Prüfungsausschuss	22
2.18	Prüfungsausschuss	23
2.19	Prüfungsausschuss	24
2.20	Prüfungsausschuss	25
2.21	Prüfungsausschuss	26
2.22	Prüfungsausschuss	27
2.23	Prüfungsausschuss	28
2.24	Prüfungsausschuss	29
2.25	Prüfungsausschuss	30
2.26	Prüfungsausschuss	31
2.27	Prüfungsausschuss	32
2.28	Prüfungsausschuss	33
2.29	Prüfungsausschuss	34
2.30	Prüfungsausschuss	35
2.31	Prüfungsausschuss	36
2.32	Prüfungsausschuss	37
2.33	Prüfungsausschuss	38
2.34	Prüfungsausschuss	39
2.35	Prüfungsausschuss	40
2.36	Prüfungsausschuss	41
2.37	Prüfungsausschuss	42
2.38	Prüfungsausschuss	43
2.39	Prüfungsausschuss	44
2.40	Prüfungsausschuss	45
2.41	Prüfungsausschuss	46
2.42	Prüfungsausschuss	47
2.43	Prüfungsausschuss	48
2.44	Prüfungsausschuss	49
2.45	Prüfungsausschuss	50
2.46	Prüfungsausschuss	51
2.47	Prüfungsausschuss	52
2.48	Prüfungsausschuss	53
2.49	Prüfungsausschuss	54
2.50	Prüfungsausschuss	55
2.51	Prüfungsausschuss	56
2.52	Prüfungsausschuss	57
2.53	Prüfungsausschuss	58
2.54	Prüfungsausschuss	59
2.55	Prüfungsausschuss	60
2.56	Prüfungsausschuss	61
2.57	Prüfungsausschuss	62
2.58	Prüfungsausschuss	63
2.59	Prüfungsausschuss	64
2.60	Prüfungsausschuss	65
2.61	Prüfungsausschuss	66
2.62	Prüfungsausschuss	67
2.63	Prüfungsausschuss	68
2.64	Prüfungsausschuss	69
2.65	Prüfungsausschuss	70
2.66	Prüfungsausschuss	71
2.67	Prüfungsausschuss	72
2.68	Prüfungsausschuss	73
2.69	Prüfungsausschuss	74
2.70	Prüfungsausschuss	75
2.71	Prüfungsausschuss	76
2.72	Prüfungsausschuss	77
2.73	Prüfungsausschuss	78
2.74	Prüfungsausschuss	79
2.75	Prüfungsausschuss	80
2.76	Prüfungsausschuss	81
2.77	Prüfungsausschuss	82
2.78	Prüfungsausschuss	83
2.79	Prüfungsausschuss	84
2.80	Prüfungsausschuss	85
2.81	Prüfungsausschuss	86
2.82	Prüfungsausschuss	87
2.83	Prüfungsausschuss	88
2.84	Prüfungsausschuss	89
2.85	Prüfungsausschuss	90
2.86	Prüfungsausschuss	91
2.87	Prüfungsausschuss	92
2.88	Prüfungsausschuss	93
2.89	Prüfungsausschuss	94
2.90	Prüfungsausschuss	95
2.91	Prüfungsausschuss	96
2.92	Prüfungsausschuss	97
2.93	Prüfungsausschuss	98
2.94	Prüfungsausschuss	99
2.95	Prüfungsausschuss	100

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Neuweiler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Zettler
Sondergutachter: Prof. Dr. A. Dörge
Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 1987

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	7
2.1 Die Krötenharnblase als Modell für den transepithelialen Natriumtransport	7
2.2 Das Koefoed-Johnsen und Ussing Modell	12
2.3 Regulation des transepithelialen Natriumtransportes durch das Mineralcorticoid Aldosteron	17
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1 Präparation der Harnblasen	25
3.2 Lösungen und Pharmaka	27
3.3 Versuchsdurchführung und Auswertung	28
3.3.1 Durchführen der Kammerversuche	29
3.3.2 Einfrieren der Proben und Herstellen gefriergetrockneter Kryoschnitte	33
3.3.3 Röntgenmikroanalyse der Harnblasenschnitte	38
3.3.3.1 Prinzip der Elektronenstrahlmikroanalyse	38
3.3.3.2 Analyse der Gewebeschnitte	39
3.3.4 Auswertung der Spektren	44
3.3.5 Quantifizierung der Elementkonzentrationen	45
3.3.6 Statistik	52

4.	ERGEBNISSE	53
4.1	Identifizierung der verschiedenen Zelltypen des Blasen- epithels	53
4.2	Elementkonzentrationen im Kern und Zytoplasma	59
4.3	Wirkung von Aldosteron bei Inkubation in pyruvathalti- ger Ringerlösung	62
4.4	Wirkung von Aldosteron bei Inkubation im Nährmedium (L-15)	68
4.4.1	Eigenwirkung des L-15 Nährmediums	68
4.4.2	Versuche an Harnblasen von nicht NaCl-adaptierten Tieren	71
4.4.3	Versuche an Harnblasen von NaCl-adaptierten Tieren	76
4.5	Wirkung des antidiuretischen Hormons (AVP) auf den transepithelialen Natriumtransport und die zellulären Elementkonzentrationen	85
5.	DISKUSSION	91
5.1	Elementkonzentrationen im Kern und Zytoplasma	91
5.2	Wirkung von Aldosteron	93
5.2.1	Wirkung von Aldosteron auf die transepitheliale Natriumtransportrate	93
5.2.2	Wirkung von Aldosteron auf die zellulären Natrium- und Kaliumkonzentrationen	97
5.3	Vergleich der Wirkung von Aldosteron und AVP auf die transepitheliale Natriumtransportrate und die zellu- lären Natriumkonzentrationen	106
6.	ZUSAMMENFASSUNG	115
7.	LITERATUR	118

1. EINLEITUNG

Alle Organismen sind im physikalischen Sinne "offene Systeme", d.h. sie stehen mit ihrer Umgebung in einem ständigen Stoff- und Energieaustausch. Dieser dynamische Zustand lebender Systeme schließt umfangreiche Transportvorgänge ein, die so organisiert sein müssen, daß trotz des fortwährenden Stoff- und Energiewechsels die spezifische Zusammensetzung des Organismus und seiner Teilsysteme erhalten bleibt und sich ein sogenanntes Fließgleichgewicht einstellen kann.

Diese Transportvorgänge können an undifferenzierten Körperoberflächen stattfinden, sind jedoch in den meisten Fällen an spezialisierte Gewebe, wie Darm-, Atmungs- und Exkretionsepithelien, gebunden, die den Stoffaustausch des Organismus mit dem Außenmedium durch selektive passive und aktive transepitheliale Substanzbewegungen vermitteln.

Von besonderer Bedeutung ist der aktive Transport von Natrium. Zum einen macht es mit seinen dazugehörenden Anionen (Chlorid und Bikarbonat) in der Regel über 90 % der osmotisch wirksamen Teilchen der extrazellulären Flüssigkeit aus und ist damit für die Aufrechterhaltung des Flüssigkeitsvolumens im Extrazellularraum verantwortlich, zum anderen sind eine ganze Reihe weiterer transepithelialer Transporte, wie z.B. der der Glukose, der von Aminosäuren und der anderer Elektrolyte, vom Natriumtransport abhängig.

Die meisten Lebewesen, insbesondere höher organisierte Formen, verfügen über spezifische den Natriumhaushalt regulierende Absorptions- und Exkretionsorgane, deren Epithelzellen befähigt sind, Natrium aktiv transzellulär zu transportieren. Marine Teleostier, die in einem hypertonen Außenmedium leben, oder viele marine Vögel und Reptilien können beispielsweise überschüssiges Salz, im engeren Sinne

Natriumchlorid, über die Kiemen bzw. spezielle Salzdrüsen extrarenal ausscheiden. Umgekehrt sind die Kiemen von Süßwasserfischen in der Lage, Salzverluste durch eine aktive Absorption aus dem Außenmedium auszugleichen. An der Regulation des Natriumhaushaltes sind ferner der Gastrointestinaltrakt und die Nierensysteme beteiligt.

Der Nachweis eines aktiven Natriumtransportes durch Epithelien ging erstmals aus Untersuchungen an der Bauchhaut des Frosches hervor. Bei Salz-mangel können diese Tiere mit den resorbierenden Epithelzellen ihrer Hautoberfläche dem umgebenden Wasser noch Natrium bis hinab zu einer Konzentration von 10^{-5} M entziehen (Krogh, 1937 und 1938).

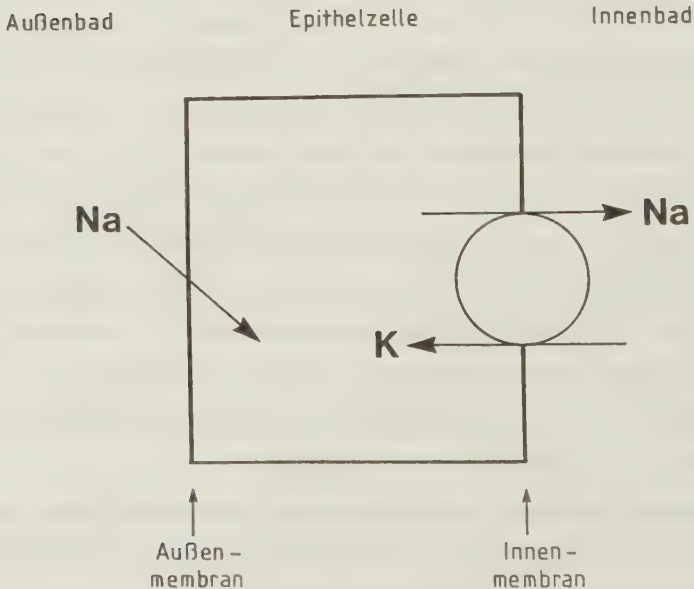


Abb.1: 2-Membranen-Modell des transepithelialen Natriumtransportes.

Auch das von Koefoed-Johnsen und Ussing (1958) entwickelte Transportmodell, welches sich in seinen Grundzügen auf nahezu alle transportaktiven Epithelien übertragen läßt, wurde aus Versuchen an der isolierten Froschhaut gefolgert.

Nach diesem Modell (Abb. 1) erfolgt der Natriumtransport durch das Epithel in zwei Einzelschritten. Natrium strömt passiv von außen, entlang eines elektrochemischen Gradienten durch die apikale Membran in das Zellkompartiment ein und verläßt dieses aktiv unter Verbrauch von Stoffwechselenergie im Austausch gegen Kalium (Na-/K-Pumpe) über die basolaterale Membran.

Damit die spezifische Zusammensetzung und das konstante Volumen der extrazellulären Flüssigkeitsräume trotz fortwährender Transportprozesse aufrechterhalten bleiben, unterliegt der Natriumtransport durch das Epithel einer strengen Kontrolle. Neben einer nervösen Beeinflussung wird diese Kontrolle von mineralcorticoiden Hormonen der Nebennierenrinde und von Peptidhormonen der Neurohypophyse übernommen. Die bedeutendste Rolle in diesem Zusammenhang spielt das Mineralcorticoid Aldosteron, welches bei allen tetrapoden Wirbeltieren und dem Menschen vertreten ist und dessen Hauptfunktion in der Stimulation des Natriumtransportes besteht (Sawyer, 1956; Maetz, 1959; Bishop et al., 1961; McAfee und Locke, 1961; Crabbé, 1961 a und b; Imamura und Sasaki, 1962; Porter und Edelman, 1964; Sharp und Leaf, 1964 a und b; Fanestil und Park, 1981; u.a.).

Trotz zahlreicher Untersuchungen in den vergangenen Jahrzehnten ist die Frage, wie dieses Hormon auf den Transportmechanismus einwirkt, nicht endgültig geklärt. Einige Befunde sprechen für einen hormonen Effekt auf die Natriumpermeabilität der apikalen Membran (Crabbé und de Weer, 1969; Civan und Hoffman, 1971; Handler et al.,



1972; Leaf und Macknight, 1972; Saito und Essig, 1973; Spooner und Edelman, 1975; Cuthbert und Shum, 1975 und 1976; Frizzell und Schultz, 1978; Nagel und Crabbé, 1980; Eaton, 1981; Palmer et al., 1982; Sariban-Sohraby et al., 1984). Andere Daten deuten jedoch auf eine Abhängigkeit der Stimulation des Natriumtransportes durch Aldosteron von den energetischen Parametern des Systems hin. Dies führt zu der Auffassung, daß das Hormon die Eigenschaften der basolateralen Membran (Na-/K-Pumpe) beeinflussen könnte (Edelman et al., 1963; Porter und Edelman, 1964; Sharp und Leaf, 1964a und 1966; Fimognari et al., 1967a; Doucet und Katz, 1981; Girardet et al., 1981; Geering et al., 1982).

Nach dem oben dargelegten 2-Membranen-Modell für den transepithelialen Natriumtransport sollten Analysen der intrazellulären Natriumkonzentration zur Klärung der Frage nach dem Angriffsort des Aldosterons beitragen. Eine Zunahme der Permeabilität der apikalen Membran für Natrium durch Aldosteron müßte zu einer Erhöhung der Natriumkonzentration in den Epithelzellen führen. Bei einer primären Wirkung des Hormons auf den aktiven Transportschritt durch die Erhöhung der Pumprate für Natrium wäre dagegen mit einem Abfall der intrazellulären Natriumkonzentration zu rechnen. Neben diesen beiden Möglichkeiten wäre aber auch die Stimulation beider Transportschritte denkbar, die sich bei einer gesteigerten Transportrate in einer unveränderten Natriumkonzentration in den Epithelzellen manifestieren sollte.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Aldosteron auf die Natriumtransportleistung und auf die intrazellulären Natriumkonzentrationen des Harnblasenepithels bei Kröten (*Bufo marinus*) untersucht. Seitdem bekannt ist, daß die Krötenharnblase einen aktiven

Natriumtransport aufweist (Leaf, 1955), ist diese fast ebenso häufig wie die isolierte Froschhaut zu Modellversuchen des transepithelialen Natriumtransportes herangezogen worden. Besonders zur natriiferischen Wirkung von Aldosteron wurden bereits zahlreiche Untersuchungen an diesem Organ durchgeführt, so daß viele Vergleichsdaten zur Verfügung stehen. Gegenüber dem mehrschichtigen Froschhautepithel weist die Harnblase den Vorteil auf, ein funktionell einschichtiges Epithel zu sein, wodurch die Interpretation der Meßergebnisse der intrazellulären Natriumkonzentrationen erleichtert wird. Hinzu kommt, daß bei der Harnblase die Hauptwirkung des Hormons nur in einer Stimulation des Natriumtransportes besteht. Bei der Froschhaut hingegen führt Aldosteron zusätzlich zu einer verstärkten Häutung, welche sich in den intrazellulären Konzentrationen der äußeren Zellschicht niederschlägt.

Für die Untersuchungen der Wirkung von Aldosteron auf die Natriumtransportrate wurde die von Ussing und Zehran (1951) eingeführte Kurzschlußstrommethode gewählt. Mit Hilfe dieser "klassischen" Methode können über Stunden hinweg in-vitro Versuche an isolierten Froschhäuten, Gallenblasen, Harnblasen u.a. durchgeführt werden, wobei der gemessene Kurzschlußstrom (short-circuit-current, SCC) als leicht meßbarer quantitativer Parameter ständig Auskunft über die Natriumtransportleistung des jeweiligen Epithels gibt. Für die Messungen der intrazellulären Natriumkonzentrationen wurde die Elektronenstrahlmikroanalyse angewandt, die in den vergangenen Jahren in zunehmenden Maße für biologische Fragestellungen eingesetzt wurde (Robison et al., 1971; Ingram et al., 1972; Dörge et al., 1974 und 1975; Kirk et al., 1974; Rick et al., 1978 a und b).

Die Elektronenstrahlmikroanalyse wurde an gefriergetrockneten etwa

1 μ m dicken Kryoschnitten in einem Rasterelektronenmikroskop durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Anregung elementcharakteristischer Röntgenstrahlen durch schnelle Elektronen und auf deren Nachweis mittels energiedispersiver Röntgenanalyse. Neben Natrium kann eine Vielzahl weiterer Elemente, wie Chlor, Kalium, Phosphor oder Kalzium, erfaßt werden. Das räumliche Auflösungsvermögen der verwendeten Meßapparatur ist so groß, daß die Elemente nicht nur in den einzelnen Epithelzellen, sondern auch getrennt im Kern und Zytoplasma bestimmt werden können.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist die quantitative Analyse der Natriumkonzentration in den Zellen des Harnblasenepithels bei Stimulation des Natriumtransportes durch Aldosteron. Hierdurch sollten Aufschlüsse über den Transportmechanismus und dessen Beeinflussung durch das Hormon erhalten werden. Um die am transepithelialen Natriumtransport beteiligten Zellen genauer zu identifizieren, wurden bei den Elementbestimmungen soweit als möglich die verschiedenen Zelltypen des Epithels berücksichtigt. Die Wirkung von Aldosteron wurde außerdem mit der des antidiuretischen Hormons der Neurohypophyse (Argininvasopressin, AVP) verglichen. AVP führt an der isolierten Harnblase neben einer Steigerung der Wasserpermeabilität zu einer Stimulation des Natriumtransportes (s. Übersichtsartikel Andreoli und Schafer, 1976 und Macknight et al., 1980), welche durch eine Erhöhung der Permeabilität der apikalen Membran für Natrium erklärt werden kann (Curran et al., 1963; Civan und Frazier, 1968; Rawlins et al., 1970; Cereijido und Rotunno, 1971; Biber und Cruz, 1973; Rick et al., 1984). Für den Fall, daß der Wirkungsmechanismus der beiden Hormone derselbe ist, sollte bei vergleichbarer Transportstimulation der Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentrationen gleich hoch sein.

LITERATURÜBERSICHT

Die Krötenharnblase als Modell für den transepithelialen Natriumtransport

Seit mehr als 100 Jahren ist die elektrische Aktivität von Amphibienepithelien Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Bereits 1848 entdeckte Du Bois-Reymond, daß die Froschhaut zwischen der Innen- und Außenseite eine elektrische Potentialdifferenz von etwa 80 mV aufrechterhält, wobei die Hautinnenseite positiv geladen ist.

Nach den Beobachtungen von Galeotti (1904) hängt die Potentialbildung von der Anwesenheit von Natrium- oder Lithium-Ionen im Außenbad ab. Als Ursache für die Potentialbildung nahm er eine gerichtete Permeabilität für diese Kationen an. Natrium sollte besser einwärts als auswärts permeieren können.

Die Natur dieser Transportprozesse konnte genauer analysiert werden, als in den 40iger Jahren radioaktive Isotope zur Analyse der unidirektionalen transepithelialen Natriumflüsse eingesetzt wurden. Katzin (1939 und 1940) und Ussing (1949) wiesen für die Froschhaut nach, daß der Einstrom von Natrium den entgegengesetzten Ausstrom bei weitem übertrifft und somit eine Netto-Natriumresorption vorliegt. Da die Netto-Natriumresorption sowohl gegen elektrische als auch chemische Gradienten, also von einem niedrigeren auf ein höheres elektrochemisches Potential erfolgen kann, charakterisierte Ussing (1949) diesen Transportmechanismus als aktiv.

Den entscheidenden methodischen Fortschritt für die Analyse transepithelialer Ionentransporte stellte die Einführung der Kurzschlußstrommethode durch Ussing und Zehran (1951) dar, mit deren Hilfe die

Netto-Natriumresorption quantitativ bestimmt werden kann. Bei der Kurzschlußstrommethode (Abb. 2) werden die äußeren treibenden Kräfte, die eine Ungleichheit der unidirektionalen passiven Ionenbewegungen verursachen könnten, ausgeschaltet. Dazu wird das Gewebe auf beiden Seiten mit Ringerlösungen gleicher Zusammensetzung inkubiert und das spontane transepitheliale elektrische Potential durch eine äußere Stromquelle auf Null kompensiert.

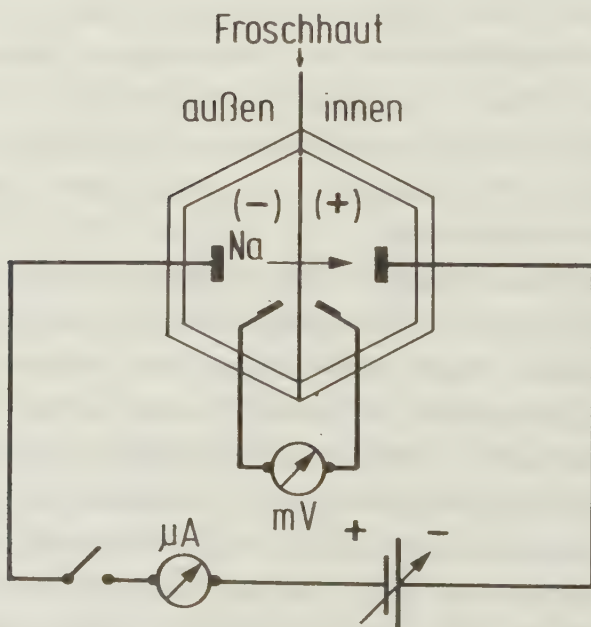


Abb. 2: Kurzschlußstromanordnung (nach Ussing und Zehran, 1951). Die transepitheliale Potentialdifferenz wird über ein Elektrodenpaar mit einem mV -Meter bestimmt. Über ein zweites Elektrodenpaar kann mit Hilfe einer variablen äußeren Gegenspannung das Potential auf Null gebracht werden.

Unter diesen symmetrischen Bedingungen, d.h. in Abwesenheit eines chemischen oder elektrischen Gradienten zwischen der mukosalen und serosalen Oberfläche der Haut, fließt ein Strom im äußeren Stromkreis (Kurzschlußstrom), der nur auf einen aktiven Ionentransport zurückgeführt werden kann. Ussing und Zehran (1951) beobachteten an der Froschhaut unter Kurzschlußstrombedingungen eine Differenz der ein- und auswärtsgerichteten Natriumbewegungen und stellten fest, daß diese Netto-Natriumresorption quantitativ mit dem gemessenen Kurzschlußstrom übereinstimmt. Die Übereinstimmung von Netto-Natriumtransport und Kurzschlußstrom konnte in einer Reihe weiterer Versuche an der Froschhaut unter verschiedenen experimentellen Bedingungen nachgewiesen werden, bei denen der Natriumtransport zum Teil stark stimuliert oder gehemmt wurde (Kirschner, 1955; Koefoed-Johnsen, 1957; Koefoed-Johnsen und Ussing, 1958; Curran et al., 1963; Dörge und Nagel, 1970; Dörge et al., 1977).

Seitdem bekannt ist, daß auch die Krötenharnblase zu einem aktiven Natriumtransport durch das Epithel befähigt ist (Leaf, 1955) und dieser transepitheliale Natriumtransport als Kurzschlußstrom gemessen werden kann (Leaf et al., 1958; Porter und Edelman, 1964; Mendoza et al., 1970; Lipson und Sharp, 1971; Wolff und Essig, 1977), gilt die Harnblase von Kröten, insbesondere von *Bufo marinus*, neben der Froschhaut als ein bevorzugtes Studienobjekt transepithelialer Transportvorgänge.

Die Harnblase übernimmt bei den Amphibien eine bedeutende Rolle im Rahmen der Wasser- und Salzhomöostase. Sie stellt ein Flüssigkeitsreservoir dar, aus welchem bei Bedarf Wasser und die darin gelösten Salze auch bei Abwesenheit osmotischer und hydrostatischer Druckdifferenzen rückresorbiert werden. Funktionell gesehen gleicht die

Krotenharnblase dem distalen Tubulusabschnitt eines Säugernephrons (Leaf et al., 1958; Sharp und Leaf, 1966).

Natrium wird vom Harnblasenepithel aus der luminalen Flüssigkeit, dem Urin, resorbiert, wodurch die Harnblase in die Lage versetzt wird, einen großen chemischen Gradienten zwischen der Körperflüssigkeit und dem Urin aufzubauen. So wurden im Plasma Natriumkonzentrationen von 100 bis 130 mM gegenüber Urinkonzentrationen von nur 0.5 mM ermittelt (Leaf et al., 1958). Aus dem gerichteten aktiven Natriumtransport resultiert eine relativ hohe Potentialdifferenz (Serosaseite positiv) von 20 bis 50 mV zwischen der Mukosa- und der Serosaseite der Harnblase, die auf eine geringe passive Leitfähigkeit des Gewebes für Ionen schließen läßt (Leaf, 1965).

Diese relativ hohe Potentialdifferenz weist die Krötenharnblase wie auch die Froschhaut als "dichtes" (tight) Epithel aus. Auch der elektrische Widerstand des Blasengewebes liegt mit $1-2 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$ (Civan und Hoffman, 1971) deutlich über dem von "lecken" (leaky) Epithelien, wie Dünndarm, Gallenblase oder proximaler Tubulus. "Lecke" Epithelien weisen im allgemeinen nur einen Widerstand von $10-200 \Omega\cdot\text{cm}^2$ auf (siehe Übersichtsartikel von Macknight et al., 1980). Die Unterschiede in den elektrischen Eigenschaften von "dichten" und "lecken" Epithelien ergeben sich aus dem unterschiedlichen Verhältnis von zellulärer und parazellulärer Leitfähigkeit in den einzelnen Geweben. Während in "lecken" Epithelien der parazelluläre Transportweg eine relativ hohe elektrische Leitfähigkeit aufweist (Lundberg, 1957; Hoshi und Sakai, 1967; Boulpaep und Seely, 1971; Frizzell und Schultz, 1972), ist diese in "dichten" Epithelien deutlich geringer (Ussing und Windhager, 1964; Urakabe et al., 1970; Mandel und Curran, 1972 a und b; Erlij und Martinez-Palomo, 1972 und 1973; Wade et al., 1973). Da

der parazelluläre Transportweg den Interzellulärspalten des Epithels entspricht (Frömter, 1972) und diese apikal durch die "tight junctions" (Schlußleisten (Bonnet, 1895); zonulae occludentes (Farquhar und Palade, 1963 und 1965) begrenzt werden, können die unterschiedlichen Transporteigenschaften von "lecken" und "dichten" Epithelien weitgehend auf unterschiedliche Permeabilitäten der "tight junctions" zurückgeführt werden (Claude und Goodenough, 1973; Staehelin, 1974; Ussing et al., 1974; Erlij und Martinez-Palomo, 1978). Während die "tight junctions" in "lecken" Epithelien z.B. für Lanthanionen durchlässig sind, sind sie in "dichten" Epithelien für diese Ionen vollständig undurchlässig (Whittembury, 1964; Martinez-Palomo et al., 1971; Castel et al., 1972; Machen et al., 1972; Erlij und Martinez-Palomo, 1973; Tisler und Yarger, 1973). Die Permeabilität der "tight junctions" ist jedoch veränderbar. In der Froschhaut kann ihre Durchlässigkeit für Ionen z.B. durch Erhöhung der Osmolarität im Außenbad drastisch zunehmen (Lindley und Hoshiko, 1964; Ussing und Windhager, 1964; Franz und van Bruggen, 1967; Erlij und Martinez-Palomo, 1972).

2.2 Das Koefoed-Johnsen und Ussing Modell

1958 entwickelten Koefoed-Johnsen und Ussing für den transepithelialen Natriumtransport der Froschhaut ein Modell, welches in seinen Grundzügen auch für die Krötenharnblase gilt. Nach diesem Modell (Abb. 1) hat Natrium auf seinem Weg durch das Epithel eine äußere Zellmembran, ein zelluläres Kompartiment und eine innere Zellmembran zu passieren. Das Natrium strömt passiv, entlang eines elektrochemischen Gradienten über die äußere Membran in das zelluläre Kompartiment ein und wird aktiv, unter Verbrauch von Stoffwechselenergie, im Austausch gegen Kalium über die innere Membran heraustransportiert. Das einwärts transportierte Kalium diffundiert passiv wieder in das Innenbad zurück. Das Koefoed-Johnsen und Ussing Modell basiert im wesentlichen auf den folgenden experimentellen Befunden:

(1) Änderungen der Natriumkonzentration in der äußeren epithelseitigen oder der Kaliumkonzentration in der inneren coriumseitigen Badelösung führen zu Änderungen des transepithelialen Potentials. Dabei ändert sich das Potential über einen weiten Bereich linear mit dem Logarithmus der Natrium- bzw. Kaliumkonzentration (Koefoed-Johnsen und Ussing, 1958; Kidder et al., 1964). Die äußere Oberfläche des Gewebes verhält sich also wie eine Natriumelektrode und die innere Oberfläche zeigt das typische Verhalten einer Kaliumelektrode.

(2) Potentialmessungen an der Froschhaut mit Glaselektroden haben gezeigt, daß sich die transepitheliale Potentialdifferenz aus

zwei etwa gleich großen positiven Potentialsprungen zusammensetzt (Hoshiko und Engbaek, 1956; Engbaek und Hoshiko, 1957).*

(3) Die Erniedrigung der Kaliumkonzentration im Innenbad bewirkt eine Hemmung des transzellularen Natriumtransportes (Fukuda, 1942; Huf und Wills, 1951; Huf et al., 1955).

Koefoed-Johnsen und Ussing folgerten aus diesen Befunden, daß die Außenmembran selektiv permeabel für Natrium und die Innenmembran selektiv permeabel für Kalium ist. Die unterschiedlichen Permeationseigenschaften der beiden Membranen und die Konzentrationsunterschiede zwischen zellularem Kompartiment und Badelosung bilden die Voraussetzung für die Existenz eines Natriumdifusionspotentials an der Außen- und eines Kaliumdifusionspotentials an der Innenmembran. Beide zusammen ergeben das transepitheliale Potential. Nach dem von Koefoed-Johnsen und Ussing aufgestellten Modell resultiert aus den charakteristischen Eigenschaften der Außenmembran, ihrer hohen Natriumpermeabilität und dem Fehlen von aktiven Ionenpumpen, die Polarisierung der Epithelzellen und damit ihre Befähigung zum gerichteten transepithelialen Transport. Der von anderen Teilchenbewegungen unabhängige, elektrogene Natriumeinstrom ist vor allem durch seine spezifische Hemmbarkeit durch das Diuretikum Amilorid charakterisiert (Eigler et al., 1967; Bentley, 1968; Dörge und Nagel, 1970; Biber, 1971; Erlij und Smith, 1973; Moreno et al., 1973; Cuthbert und

* Nach neueren Erkenntnissen (Nagel, 1976) ist die elektrische Potentialdifferenz über die Außenmembran unter nicht kurzgeschlossenen Bedingungen negativ.

Shum, 1974; Rick et al., 1975). Der Natriumtransport über die äußere Membran ist zudem durch das antidiuretische Hormon der Neurohypophyse (Fuhrmann und Ussing, 1951; Curran et al., 1963; Cereijido und Rotunno, 1971; Handler et al., 1972; Biber und Cruz, 1973) und durch das Antibiotikum Novobiocin (Cruz und Biber, 1976) stimulierbar. Ursprünglich wurde für den Natriumeinstrom ein Carriermechanismus angenommen, da eine Sättigung des Natriumeinstroms bei hohen Natriumkonzentrationen im Außenbad erfolgt (Cereijido et al., 1964; Biber und Sanders, 1973). Neuere Untersuchungen mit Hilfe der elektrischen Rauschanalyse weisen dagegen auf eine Diffusion des Natriums durch Poren hin (Lindemann und van Driessche, 1977; Palmer et al., 1980 und 1982; Garty et al., 1983). Diese Hypothese wurde in jüngster Zeit durch direkte Messungen des Einzelkanalstroms in einem Amiloridempfindlichen Epithel bestätigt (Hamilton und Eaton, 1985).

Im Gegensatz zur äußeren Zellmembran weist die innere Membran Eigenschaften auf, wie sie für die Zellmembranen der meisten Körperzellen gelten. Neben einer hohen Permeabilität für Kalium und einer niedrigen für Natrium sind in dieser Membran aktive Natrium-/Kaliumaustauschpumpen lokalisiert. Die Pumpen sind in der Krötenharnblase, wie auch in anderen Epithelien, mit der von Skou (1957, 1960 und 1965) erstmalig beschriebenen Natrium-, Kalium-, Magnesium-abhängigen ATPase assoziiert. Zu dieser Annahme führten die folgenden Befunde:

- (1) Die Epithelzellen der Harnblase von Amphibien enthalten dieses Enzym (Bonting und Caravaggio, 1963; Bonting und Canady, 1964; Asano et al., 1970; Cortas und Walser, 1971).

(2) Der transepitheliale Natriumtransport kann durch das Herzglykosid Ouabain, einen spezifischen Hemmstoff der Na-K-ATPase (Schatzmann, 1953; Glynn, 1957; Whittam, 1958), nahezu vollständig gehemmt werden (Bonting und Caravaggio, 1963; Bonting und Canady, 1964; Asano et al., 1970; Cortas und Walser, 1971; Macknight et al., 1975).

(3) In Amphibienepithelien konnte eine ^3H -Ouabain Bindung an die basolaterale Oberfläche der Zellen festgestellt werden (Mills und Ernst, 1975). Die Lokalisation der natrium- und kaliumabhängigen Ouabain-hemmbar~~n~~en ATPase an der inneren Membran wurde durch weitere autoradiographische und histochemische Verteilungsstudien an intakten Epithelien (Farquhar und Palade, 1966; Schmidt und Dubach, 1971; Stirling, 1972 und 1976; Mills et al., 1977) wie auch durch Enzymanalysen an isolierten Plasmamembranen (Fujita et al., 1972; Kinne et al., 1975) bestätigt.

Die ursprüngliche Annahme von Ussing und seinen Mitarbeitern, daß die Na-/K-Pumpe elektroneutral sei, also ein 1:1 Austausch von Natrium gegen Kalium vorliegt, konnte in der Folgezeit nicht bestätigt werden. Messungen der Kaliumaustauschraten an der Innenmembran zeigten, mit einer Ausnahme (Finn und Nellans, 1972), keine Korrelation zwischen der Kaliumaufnahme und dem Natriumtransport an der Froschhaut (Curran und Cereijido, 1965; Candia und Zadunaisky, 1972). Für die Krötenharnblase wird ebenfalls ein elektrogener Pumpenmechanismus angenommen. Für diese Annahme spricht der elektrophysiologische Befund, daß die Potentialdifferenz an der basolateralen Membran trotz einer Erhöhung der Kaliumkonzentration im Innenbad auf-

rechterhalten wird (Frazier und Leaf, 1963; Finn, 1974). Weitere Hinweise für einen elektrogenen Pumpenmechanismus lieferte die Beobachtung, daß der Natriumtransport der Krötenharnblase durch niedrige Kaliumkonzentrationen im Innenbad nicht oder nur unwesentlich gehemmt wird (Essig, 1965). Durch Messungen der Koppelung von Kaliumaufnahme und Natriumausstrom konnte ferner gezeigt werden, daß die Kaliumaufnahme rate des Harnblasengewebes weder durch eine Inhibition noch durch eine Stimulation des transepithelialen Natriumtransportes wesentlich beeinflußt wird. Selbst bei einer nahezu vollständigen Hemmung des Natriumtransportes wird über die basolaterale Membran immer noch mehr als zweimal soviel Natrium nach außen wie Kalium in das Zellinnere transportiert (Essig und Leaf, 1963). Die exakte Stöchiometrie der Na-/K-Pumpe in der Krötenharnblase konnte bisher jedoch wegen der limitierenden Aussagekraft der angewandten Methoden nicht bestimmt werden. Ein ungleiches Austauschverhältnis von Natrium und Kalium wurde neben der Froshhaut und der Krötenharnblase für eine Vielzahl weiterer Epithelien beschrieben, wie z.B. für die Necturus Harnblase, den Dünndarm oder die Nierentubuli bei Säugern (Schultz et al., 1974; Boulpaep, 1976 und 1977; Frömter und Gebler, 1977; Higgins et al., 1977). Für nicht-epitheliale Zellen wird heute allgemein ein Natrium-Kalium-Austauschverhältnis von 3:2 akzeptiert, wie es z.B. für Erythrozyten (Glynn und Karlish, 1975) und Nerven- und Muskelzellen (Thomas, 1972) nachgewiesen wurde.

3 Regulation des transepithelialen Natriumtransportes durch das Mineralcorticoid Aldosteron

Seitdem bekannt ist, daß die Haut und Harnblase von Amphibien zu einem aktiven transepithelialen Natriumtransport befähigt sind, gehen zahlreiche Bemühungen dahin, an diesen Epithelien modellhaft den Wirkungsmechanismus von Hormonen aufzuzeigen, die im Nephron von Säugern nachweislich die Rückresorption von Natrium steuern. In diesem Zusammenhang interessiert in erster Linie das Nebennierenrindenhormon Aldosteron, welches u.a. im distalen Tubulusabschnitt des Säugernephrons wirksam ist (Vander et al., 1958; Mc Evoy et al., 1964). Der Entdeckung dieses Hormons im Jahre 1953 (Simpson et al., 1953) gingen zahlreiche Untersuchungen voraus. Nachdem die Nebenniere vor etwa 400 Jahren als eigenständige Struktur von dem Anatom Bartholomeus Eustachius beschrieben worden war, beschäftigte die Bedeutung dieses Organs die Wissenschaft bis in der Mitte des vorigen Jahrhunderts Addison die Symptome des Nebennierenversagens beim Menschen beschrieb (Addison, 1855). Einen direkteren Nachweis der Rolle der Nebenniere im Elektrolytmetabolismus erbrachten die Studien von Baumann und Kurland (1927), in denen nach Entfernen der Nebenniere bei Katzen eine Abnahme der Natrium- und ein Anstieg der Kalium- und Magnesiumkonzentrationen im Plasma nachgewiesen wurden. Etwa 10 Jahre später wurden die ersten in den Elektrolythaushalt eingreifenden Corticoide aus der Nebenniere isoliert: Deoxycorticosteron und Corticosteron (Reichstein, 1937; Steiger und Reichstein, 1938). Wenig später wurde von Hartman und seinen Mitarbeitern (1939) ein Nebennierenrindenextrakt gewonnen, welcher bei adrenaletomierten Katzen und Hunden eine Natrium-retinierende Wirkung zeigte. Den ersten quantitativen

Nachweis der Wirkung dieses Nebennierenrindenextraktes auf den Elektrolythaushalt ergaben die Messungen von Simpson und Tait (1952), die mittels eines Bioassays die $^{24}\text{Na}/^{42}\text{K}$ -Rate im Urin von adrenalektomierten Ratten bestimmten. Damit war der Weg für die Entdeckung von Aldosteron beschritten und ein Jahr später gelang es Simpson und Tait in Zusammenarbeit mit zwei Arbeitsgruppen in der Schweiz (Simpson et al., 1953), aus Rindernebennieren eine kristalline Substanz zu extrahieren, welche als 11 β ,21-dihydroxy-3,20-dioxo-4-pregnen-18-al (d-Aldosteron) identifiziert wurde.

Aldosteron wird nicht allein in Nebennieren von Säugern, wie Ratten (Giroud, 1956), Affen (Simpson et al., 1952) oder Hunden (Simpson und Tait, 1952; Farrell et al., 1954), gebildet, sondern auch in Nebennieren von Amphibien, wie *Rana catesbeiana* (Carstensen et al., 1961) und *Bufo marinus* (Crabbé, 1961 a und b). Im Plasma von *Bufo marinus* wurden z.B. etwa 100-fach höhere Aldosteronkonzentrationen als beim Menschen ermittelt (Tait et al., 1961).

Die stimulierende Wirkung von Aldosteron auf den Natriumtransport wurde zunächst in in-vivo und in-vitro Versuchen für die Haut von Amphibien nachgewiesen (Sawyer, 1956; Maetz, 1959; Bishop et al. 1961; McAfee und Locke, 1961; Imamura und Sasaki, 1962). Für die Harnblase von Kröten wurde die Wirkung von Aldosteron erstmals von Crabbé (1961 a und b) beschrieben. Crabbé wies durch Messungen der ein- und auswärtsgerichteten Natriumflüsse mit radioaktiven Isotopen nach, daß der Anstieg des Kurzschlußstromes nach Aldosteron auf einen äquivalenten Anstieg der Netto-Natriumtransportrate der Harnblase zurückzuführen ist. Zahlreiche Studien an der Krötenharnblase mit verbesserten Randbedingungen folgten, so daß die Aldosteroneffekte ausgeprägter und reproduzierbarer wurden. So zeigten Porter und

Edelman (1964), daß nach vorheriger Inkubation der Blasen für 12 bis 15 Stunden in Ringerlösungen die nachfolgende Aldosteronantwort stärker ausfiel. Sharp und Leaf (1964 a und b) erzielten eine stärkere Kurzschlußstromstimulation durch Aldosteron, wenn sie die Kröten vor Versuchsbeginn für 24 bis 48 Stunden in 0.6 % NaCl-Lösungen inkubierten, um so die endogene Aldosteronsekretion der Tiere zu reduzieren.

Unabhängig von den jeweiligen Randbedingungen reagieren Krötenharnblasen erst nach einer zeitlichen Verzögerung von 30 bis 90 Minuten nach Applikation von Aldosteron zur serosalen Badlösung mit einem Anstieg des Kurzschlußstromes (Crabbé, 1961 a und b, Sharp und Leaf, 1964 a und b, Porter und Edelman, 1964). Während das Ausmaß der Aldosteronantwort von der Konzentration abhängt, stellte Crabbé fest, daß diese Latenzphase auch durch höhere Aldosteronkonzentrationen nicht wesentlich verkürzt werden kann. Eine maximale Stimulation des Kurzschlußstromes wurde bei Aldosteronkonzentrationen von etwa 10^{-7} M beobachtet (Sharp und Leaf, 1964 a; Porter und Edelman, 1964).

Die für Aldosteron charakteristische Latenzphase von 30 bis 90 Minuten läßt vermuten, daß die Wirkung des Hormons eine Reihe chemischer Reaktionen beinhaltet. Erste Hinweise dafür, daß die Wirkung von Aldosteron ähnlich wie die anderer Steroidhormone auf eine Stimulation der Proteinsynthese zurückzuführen ist, ergaben sich aus der Beobachtung, daß die stimulierende Wirkung von Aldosteron auf den Natriumtransport durch spezifische Hemmstoffe der Proteinsynthese, wie z.B. durch Actinomycin D oder durch Puromycin (Yarmolinsky und De La Haba, 1959; Hurwitz et al., 1962; Goldberg und Rabinowitz, 1962), aufgehoben werden kann (Williamson, 1963; Edelman et al., 1963; Crabbé und de Weer, 1964; Porter et al., 1964).

Edelman und Mitarbeiter (1963) entwickelten auf der Basis einer Vielzahl von Einzelexperimenten ein Modell (Abb. 3) für den molekularen Mechanismus der Wirkung von Aldosteron. Nach diesem Modell umfaßt die stimulierende Wirkung von Aldosteron auf den Natriumtransport die folgenden Einzelschritte:

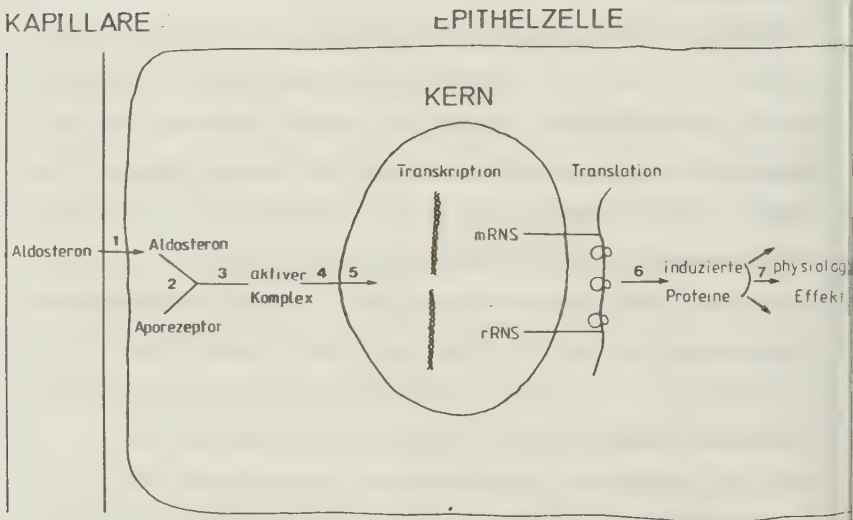


Abb. 3: Modell für den molekularen Wirkungsmechanismus von Aldosteron (nach Edelman et al., 1963)

- (1) Aldosteronaufnahme aus den Blutkapillaren in die Epithelzellen
- (2) Bindung des Aldosterons an ein Protein (Aporezeptor) im Zytoplasma
- (3) temperaturabhängige Transformation in einen aktiven Aldosteron-Aporezeptor-Komplex

- (4) Einschleusen des aktiven Aldosteron-Aporezeptor-Komplexes in den Zellkern
- (5) Modifikation des Aldosteron-Aporezeptor-Komplexes, Bindung an einen spezifischen nuklearen Rezeptor und Aktivierung oder Hemmung der Transkription
- (6) Induktion der Synthese spezifischer Proteine
- (7) Stimulation des Natriumtransportes durch die Wirkung der Aldosteron-induzierten Proteine.

Nachdem dieses Modell aufgestellt war, richtete sich das Interesse besonders auf den Mechanismus, durch welchen die Aldosteron-induzierten Proteine den transepithelialen Natriumtransport beeinflussen könnten. Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten der Beeinflussung: Der Natriumtransport könnte entweder durch eine Zunahme des passiven Natriumeinstromes in die Epithelzellen an der apikalen oder aber durch eine Zunahme der Na-/K-ATPase-Aktivität an der basolateralen Zellmembran stimuliert werden.

Der Anstieg der Rate des passiven Natriumeinstromes setzt eine Erhöhung der Permeabilität der apikalen Membran für Natrium voraus. Für die primäre Wirkung des Aldosterons auf die Natriumpermeabilität der apikalen Membran sprechen die folgenden Befunde:

- (1) die erhöhte Natriumkonzentration in den Epithelzellen der Krötenharnblase nach Aldosteron (Crabbé und de Weer, 1969; Handler et al., 1972; Leaf und Macknight, 1972)

- (2) der verminderte transepitheliale Widerstand in Aldosteron-inkubierten Krötenharnblasen, welcher vor allem auf Änderungen der elektrischen Eigenschaften der apikalen Membran beruht (Civan und Hoffman, 1971; Saito und Essig, 1973; Spooner und Edelman, 1975)
- (3) die verminderte Hemmwirkung von Amilorid bei Aldosteroninkubation (Crabbé et al., 1968; Crabbé, 1979) und eine gesteigerte Bindung dieses Diuretikums an spezifische Rezeptoren in der apikalen Membran nach Aldosteron (Cuthbert und Shum, 1975 und 1976)
- (4) die Eliminierung der Hormonwirkung durch die Applikation des Antibiotikums Amphotericin B zur mukosalen Badelösung, welches die Leitfähigkeit der apikalen Membran für Natrium maximal erhöht (Crabbé, 1967; Frizzell und Schultz, 1978)
- (5) die Aldosteron-abhängige Zunahme der apikalen Natriumleitfähigkeit, die nach den Daten der Rauschfrequenzanalyse ("shot-noise analysis") auf einen äquivalenten Anstieg der Dichte elektrisch erkennbarer Natriumkanäle in der apikalen Membran zurückzuführen ist, wobei sich der Natriumstrom des Einzelkanals nicht ändert (Palmer et al., 1982).

Andere Beobachtungen unterstützen dagegen die Annahme einer zumindest additiven Wirkung von Aldosteron auf den aktiven energieabhängigen Natriumausstrom aus den Zellen über die basolaterale Membran. An der Krötenhaut konnte beispielsweise mit Mikroelektroden eine deutliche Zunahme der basolateralen Leitfähigkeit nach Aldosteron nachgewiesen werden, die mit einem geringen, aber signifikanten Anstieg der elek-

tromotorischen Kräfte an der basolateralen Membran einherging (Nagel und Crabbé, 1980). Ferner konnte mit einigen Ausnahmen (Bonting und Canady, 1964; Hill et al., 1973; Lewis und Wills, 1983; Halm und Dawson, 1985) eine verstärkte Induktion der Na-K-ATPase nach Aldosteron gezeigt werden (Knox und Sen, 1974; Schmidt et al., 1975; Katz et al., 1979; Horster et al., 1980; Garg et al., 1981; El Mernissi et al., 1982). Diese erwies sich jedoch sekundär gegenüber der Stimulation des apikalen Natriumeinstromes (Petty et al., 1981). Außer der gesteigerten ATPase Aktivität wurde von anderen Untersuchern eine gesteigerte Aktivität verschiedener für den Energiemetabolismus zuständiger Enzyme beobachtet, welche ebenfalls für eine Wirkung des Hormons auf den aktiven Natriumtransport durch die basolaterale Membran spricht. In der Krötenharnblase z.B. beeinflußt Aldosteron verschiedene Enzymsysteme des Zitronensäurezyklus (Kirsten et al., 1968 und 1970). Auch in der Niere adrenaletomierter Ratten konnte nach Aldosteron ein Anstieg der Citratsynthetase festgestellt werden (Kinne und Kirsten, 1968; Law und Edelman, 1978 a und b). Durch Spironolakton, einen Inhibitor des mineralcorticoiden Rezeptors, und Aktinomycin D und Puromycin, Inhibitoren der Proteinbiosynthese, kann diese Hormon-induzierte Zunahme der Enzymaktivität und damit auch die Stimulation des Natriumtransportes durch Aldosteron blockiert werden (Kinne und Kirsten, 1968; Kirsten und Kirsten, 1972).

Weitere Hinweise für die Wirkung von Aldosteron auf den aktiven Natriumtransportschritt an der basolateralen Membran ergaben die Studien von Edelman und Mitarbeitern, in denen die Abhängigkeit der natriiferischen Wirkung des Hormons vom Substrat- und Energiestoffwechsel aufgezeigt wurde. Edelman und seine Mitarbeiter beobachteten, daß Harnblasen, die in substratfreiem Medium inkubiert waren, nur

wenig auf Aldosteron reagierten und die Stimulation des Natriumtransportes erst dann in vollem Umfange erfolgte, wenn nachträglich Substrate (Glukose oder Pyruvat) den Inkubationslösungen beigegeben wurden. Sie werteten diese Beobachtungen als Hinweis für die metabolische Kontrolle der Natriumpumpaktivität unter dem Einfluß von Aldosteron (Edelman et al., 1963; Porter und Edelman, 1964; Fimognari et al., 1967). Die Substratabhängigkeit der Aldosteronwirkung zeigten auch die von Sharp und Leaf (1964 a und b, 1966) unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführten Versuche. Ihrer Ansicht nach erhöht Aldosteron die Natriumpermeabilität der apikalen Membran auch in Abwesenheit von Substraten, die stimulierende Wirkung auf den Natriumtransport kommt aber erst dann zum Ausdruck, wenn der Natriumpumpe genügend Energie zur Verfügung steht.

Während Sharp und Leaf nur für den aktiven Transportschritt an der basolateralen Membran eine metabolische Kontrolle annahmen, ergaben andere Untersuchungen Hinweise dafür, daß auch die Permeabilität der apikalen Membran für Natrium von dem Energiestatus der Zellen abhängt (Finkelstein, 1964; Lipton und Edelman, 1971; Hviid-Larsen, 1972). Die Substratabhängigkeit der apikalen Leitfähigkeitserhöhung unter Aldosteron wurde in den letzten Jahren mehrfach bestätigt. In Aldosteron inkubierte Harnblasen, deren basolaterale Membran über eine Erhöhung der Kaliumkonzentration im Innenbad depolarisiert wurde, reagierten auf Substrate (im engeren Sinne Glukose und Pyruvat) im Innenbad mit einem deutlichen Anstieg ihrer Natriumtransportrate. Diese Stimulation des Natriumtransportes konnte durch entsprechende Stoffwechsellinhibitoren (Deoxyglukose und Oxythiamin) aufgehoben werden (Palmer et al., 1980; Palmer et al., 1982; Garty et al., 1983).

MATERIAL UND METHODEN

1 Präparation der Harnblasen

Die Versuche wurden an Harnblasen von weiblichen Kröten der Spezies Bufo marinus (National Reagents, Bridgeport, Connecticut) durchgeführt. Die bei Raumtemperatur in Plastikwannen gehaltenen Tiere erhielten keine Nahrung und wurden täglich zweimal für je 30 Minuten in Leitungswasser gebadet. Zur Erhöhung der Aldosteron-Empfindlichkeit wurden einige Kröten für 4-6 Tage salzadaptiert (Sharp und Leaf, 1964 a und b; Garty et al., 1983). Zu diesem Zweck wurden die Tiere in Behälter umgesetzt, die etwa 1 cm hoch mit 1/2 oder 1/1 isotoner Kochsalzlösung gefüllt waren. Zur Präparation der Harnblasen wurde das Rückenmark der Tiere im Bereich der Halswirbel durchtrennt und sondiert. Nach anschließender Öffnung des Bauchraumes waren beide Harnblasenhälften sichtbar. Mittels einer Kanüle wurde isotone Ringerlösung (siehe 3.2) über die Kloake in die Harnblase gespritzt, um die niedrige Osmolarität des Blaseninhaltes zu erhöhen. Damit sollte verhindert werden, daß die Epithelzellen beim Öffnen der Blasen von der serosalen Seite her durch den hypotonen Urin geschädigt wurden. Außerdem erleichterte diese Maßnahme bei ungenügend gefüllten Organen die weitere Präparation. Diese bestand in dem Abbinden der beiden Blasenhälften nahe ihrer Verbindungsstelle, der Isolierung und der anschließenden Übertragung in eine mit Ringer gefüllte Schale. Beide Blasenhälften wurden auf einen Plastikring gelegt (Außendurchmesser 2.6 cm, Innendurchmesser 1.6 cm), der mit einem feinen Nylonnetz bespannt war. Das Netz diente der mechanischen Stabilisierung des relativ dünnen Harnblasengewebes (40 bis 50 μm dick). Nach dem Öffnen

der Blasenhälften wurde das Gewebe über den Ring gespannt und mit einem Faden befestigt, der in einer Nut auf dem äußeren Rand des Ringes verlief. Vor dem Übertragen der Blasenhälften in die Inkubationskammern wurde die mukosale Seite mit isotoner Ringerlösung gespült, um anhaftende Blut- und Schleimreste zu entfernen.

2 Lösungen und Pharmaka

Für die Versuche in der Ussing-Kammer (siehe 3.3) wurden zwei unterschiedliche Ringerlösungen verwendet. Die Standard-Ringerlösung enthielt (in mmol/l): NaCl 110, KHCO_3 2.5, CaCl_2 1.0. Bei einigen Experimenten wurde eine phosphathaltige Ringerlösung mit folgender Zusammensetzung (in mmol/l) verwendet: NaCl 108, Na_2HPO_4 2.0, KCl 2.0, KH_2PO_4 0.5 und CaCl_2 1.0. Die Osmolarität beider Lösungen betrug 220 mOsmol/l. Nach Begasen der Lösungen mit Luft lag der pH-Wert bei 8.2 (Standard-Ringer) bzw. bei 7.2 (Phosphat-Ringer). Bei den Aldosteronversuchen wurde den Innenbadlösungen (Serosaseite der Blasen) entweder Pyruvat (5 mM, Sigma Chemie, München) oder L-15 Medium (Leibovitz-Medium, Boehringer, Mannheim) zugegeben, was bei den Ringer-Lösungen nur einen geringen Einfluß auf den pH-Wert hatte. Das L-15 Medium, das vor allem für Zellkulturen eingesetzt wird, enthält neben anorganischen Salzen (z.B. NaCl, CaCl_2 , MgSO_4 u.a.) und Zuckern (D-Galaktose und Na-Pyruvat) eine Vielzahl an Aminosäuren und Vitaminen. In der vorliegenden Untersuchung wurde die serosale Badlösung zu 50 Prozent mit dem Nährmedium versetzt. Da das Medium eine Osmolarität von 300 mOsmol/l aufwies, wurde die Badlösung mit einer entsprechenden Menge Aqua bidest auf 220 mOsmol/l verdünnt.

Aldosteron (5.4×10^{-7} M; Sigma Chemie, München) und Argininvasopressin (AVP, 150 mU/ml; Ferring, Kiel) wurden den Innenbadlösungen zugefügt. Da beide Hormone in Äthanol gelöst waren, wurden auch die Außenbadlösungen (Mukosaseite) mit der entsprechenden Äthanolmenge versetzt.

Die Albuminstandardlösungen für die Elektronenstrahlmikroanalyse (siehe 3.3.5) wurden durch Auflösen von 1 g Rinderserumalbumin

(20 g%, Behringwerke, Marburg) in jeweils 4 ml der im Versuch verwendeten mukosalen Badlösung hergestellt. Der Natrium- und Kaliumgehalt des Albuminstandards wurde flammenphotometrisch (Atomabsorptionsspektrometer SP9, Philips) und die Chloridkonzentration mit einem Chloridometer (Eppendorf) bestimmt. Der Trockengewichtsanteil des Albuminstandards wurde durch Wiegen der Probe vor und nach dem Trocknen (90°C, 3 h) ermittelt.

3.3 Versuchsdurchführung und Auswertung

Der weitere Versuchsverlauf und die Auswertung läßt sich in die folgenden Teilschritte untergliedern:

- Kammerinkubation der Harnblasen in hormonhaltigen Lösungen und Erfassen der Funktionsparameter (Blasenpotential, Kurzschlußstrom und Widerstand bzw. Leitfähigkeit, vergl. 3.3.1).
- Auftragen des Albuminstandards und Einfrieren der Proben (vergl. 3.3.2).
- Vorbereiten von Probenteilstücken für das Schneiden und Herstellen der Kryoschnitte (vergl. 3.3.2).
- Gefriertrocknen der Kryoschnitte (vergl. 3.3.2).
- Röntgenmikroanalyse der gefriergetrockneten Schnitte in dem mit einem Röntgendetektor ausgestatteten Rasterelektronenmikroskop (vergl. 3.3.3).
- Auswerten der Röntgenspektren und Bestimmen der Elektrolytkonzentrationen im Gewebe (vergl. 3.3.4, 3.3.5 und 3.3.6).

3.1 Durchführen der Kammerversuche

Der mit der Blase bespannte Ring wurde in eine Ussingkammer aus Plexiglas-kammer (Ussing und Zehran, 1951; Abb. 4 und 5) eingespannt.

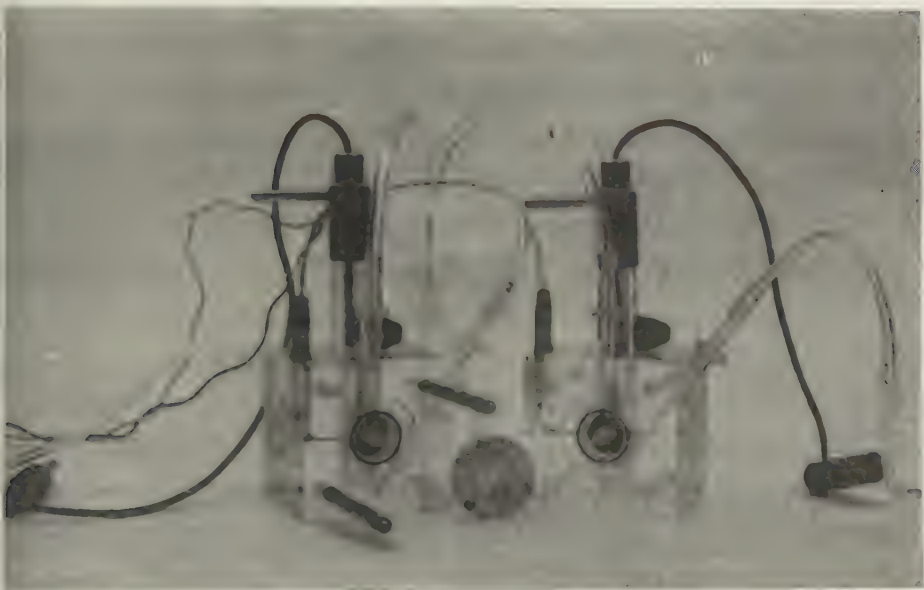


Abb. 4 Inkubationskammer (Ussingkammer) im geöffneten Zustand. Das in einen Ring eingespannte Gewebe (Mitte, hier Froschhaut) wird zwischen die beiden Kammerhälften eingesetzt. Die in die Rückwände der Halbkammern eingelassenen chlorierten Silberplatten dienen als Stromelektroden. Das Blasenpotential wird durch die beiden Kalomelelektroden gemessen, die mit der Geweboberfläche über Kaliumchlorid- oder Ringer-Agar gefüllte Plexiglasstifte in Verbindung stehen.

Die Versuchskammer bestand aus zwei miteinander verschraubbaren Hälften, zwischen die der Ring mit dem Blasengewebe sowie ein entsprechender Gegenring eingesetzt wurden. Gummiringe dienten der Abdichtung zwischen den Ringen und der jeweiligen Halbkammer. Zu-

sätzlich war der innere Rand des Gegenringes mit Vakuumpfett bestrichen, um eine Quetschung des Gewebes in den Ringen und damit sogenannte Randeffekte (edge-damage) zu vermeiden.

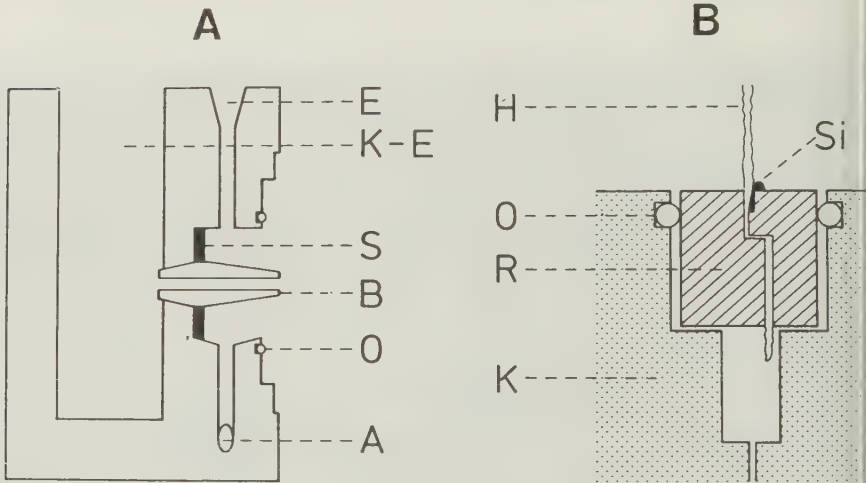
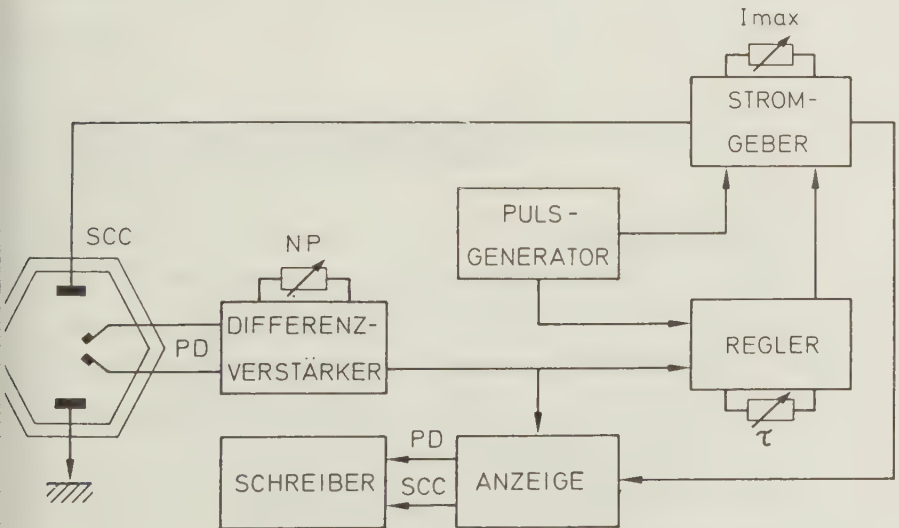


Abb. 5: Schnittbild durch eine Inkubationskammerhälfte (A) und vergrößertes Schnittbild der Befestigung der Harnblase im Ring (B). E = Einlaß; K-E = Bohrung für die Aufnahme der Kalomel-elektrode; S = Silberplatte; B = Agar-Brücke; O = Dichtungsring; A = Auslaß; H = Harnblase, R = Ring; K = Kammer; Si = Silikonfett.

Zur Erfassung der elektrischen Transportparameter der Harnblase war die Plexiglasskammer mit Strom- und Spannungselektroden ausgestattet. Als Stromelektroden dienten in die Rückwände der Halbkammern eingelassene chlorierte Silberplatten. Das Blasenpotential wurde durch Kalomelektroden (Pusl, München) gemessen, welche mit der Geweboberfläche über eine Kaliumchlorid- oder Ringer-Agarbrücke in Verbindung standen. Beide Halbkammern wurden mit Hilfe von Rollerpumpen (Eigenbau, Physiologisches Institut) getrennt perfundiert, so daß die

mukosale und die serosale Oberfläche der Harnblasen unabhängig voneinander inkubiert werden konnten. Das Füllungsvolumen einer Kammerhälfte betrug 2 ml und wurde bei einer normaler Perfusionsrate von 5 ml/min in 30 sek. vollständig ausgetauscht. Eine Blasenhälfte diente als Kontrolle, während die andere Hälfte in einer zweiten Versuchskammer hormonhaltigen Ringerlösungen ausgesetzt wurde. Die Inkubationslösungen in den Vorratsbehältern wurden während des gesamten Versuches mit Luft begast. Die Funktionsweise des Kurzschlußstromautomaten, mit dem die elektrischen Transportparameter erfaßt wurden, wird in der Abbildung 6 schematisch wiedergegeben.



6: Blockschaltbild der Kurzschlußstromautomaten.
 PD = Potentialdifferenz; SCC = Kurzschlußstrom;
 NP = Nullpunktabgleich; $I_{\max}$ = Strombegrenzung;
 T = Zeitkonstante

Der Eingangswiderstand der Kurzschlußstromautomaten betrug $> 10^9$ Ohm und war somit bei einem durchschnittlichen transepithelialen Widerstand des Harnblasengewebes von $1-2 \text{ k}\Omega\text{-cm}^2$ (Civan und Hoffman, 1971) groß genug gewählt, um nicht zu einem Spannungsabfall zu führen. Vor dem Experiment wurde die Differenz der Eigenpotentiale der Elektroden auf Null abgeglichen. Die Abbildung 7 zeigt die Schreiberregistrierung (Tintenschreiber Servogor, Metrawatt) einer typischen Versuchskurve unter Kontrollbedingungen.

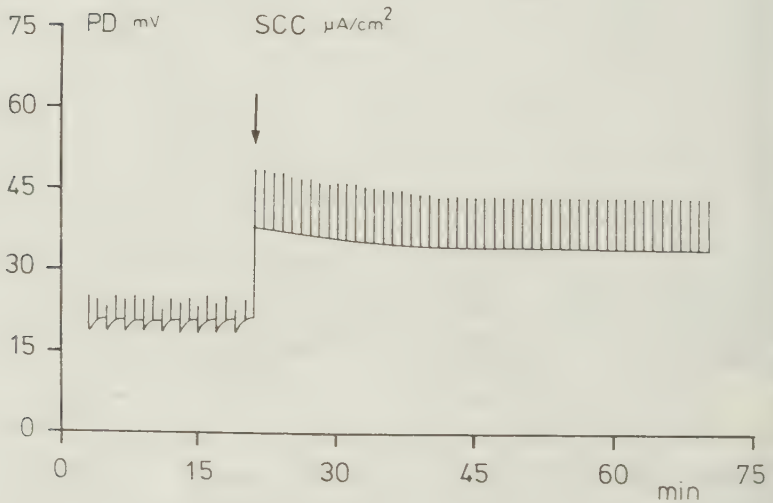


Abb. 7: Verlauf einer Versuchskurve unter Kontrollbedingungen. PD = Potentialdifferenz; SCC = Kurzschlußstrom. Senkrechte Linien (nicht skaliert) entsprechen dem relativen Blasenwiderstand bzw. der relativen Blasenleitfähigkeit (Testpuls $10 \mu\text{A}$ bzw. 10 mV). Die periodischen Potentialschwankungen sind auf Kontraktionen der glatten Harnblasenmuskulatur zurückzuführen. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Umstellung auf Kurzschlußstrombedingungen.

Nach einer kurzen Einlaufphase zur Bestimmung der transepithelialen Potentialdifferenz (PD) wurde das Blasenepithel durch kompensierende Strominjektion of 0 mV "geklemt" und der Kurzschlußstrom (short-circuit-current, SCC) registriert (ab Pfeil). Die Zeitkonstante der Stromkompensation wurde auf 30-100 msek. eingestellt. Der transepitheliale Widerstand bzw. die transepitheliale Leitfähigkeit wurden während der Spannungsregistrierung durch 500 msek. dauernde Strom- (10 μ A) und während der Bestimmung des SCC durch Spannungsimpulse (10 mV) erfaßt. Die Schwankungen im vorderen Kurvenabschnitt sind auf Kontraktionen der glatten Harnblasenmuskulatur zurückzuführen. Diese führten zu periodischen Schwankungen der Leitfähigkeit, die sich durch Potential-, aber nicht durch Stromschwankungen bemerkbar machen.

3.2 Einfrieren der Proben und Herstellen gefrieretrockneter Kryoschnitte

Im Anschluß an die Kurzschlußstromexperimente wurden die Kammern nach abschließender Bestimmung des Blasenpotentials geöffnet. Die mukosale Blasenseite wurde zur Entfernung nachträglich sezernierten Schleimes mit der im Versuch verwendeten Ringerlösung abgespült (siehe oben) und anschließend mit der Albuminstandardlösung beschichtet. Da die Einfrierrate und damit das Ausmaß von Gefrierartefakten in erster Linie durch die Probendicke bestimmt werden (Stephenson, 1956; Van Venroij et al., 1975), wurden sowohl die mukosale wie serosale Seite mit Filterpapier abgetupft. Dies hatte zur Folge, daß die mukosal aufgetragene Albuminschicht relativ dünn war und serosal anhaftende Inkubationslösung entfernt wurde. Anschließend wurde die Probe in einem Gemisch aus Propan und Isopentan (Mischungsverhältnis 4:1) bei

-196°C schockgefroren (Jehl et al., 1981). Da der gesamte Vorgang von dem Öffnen der Kammer bis zu dem Einfrieren der Probe nicht länger als 15 sek. dauerte, können wesentliche Veränderungen in der zellularen Elektrolytzusammensetzung während dieser Zeit ausgeschlossen werden. Nach dem Überführen der schockgefrorenen Proben aus dem Einfriermedium in flüssigen Stickstoff, wurde die im Versuch ausgestellte Blasenfläche von 1.6 cm^2 im Innern des Plastikringes mit Hilfe eines Skalpell's ausgestochen und bis zur weiteren Aufbereitung in kleinen Plastikgefäßen in Kryobehältern aufbewahrt, die mit flüssigem Stickstoff (-196°C) gefüllt waren. Selbst Aufbewahrungszeiten von mehreren Monaten hatten keinen Einfluß auf die im Gewebe gemessenen Elektrolytkonzentrationen.

Zur Herstellung der Kryoschnitte wurden aus den eingefrorenen Proben etwa 2 bis 3 mm große dreieckige Stücke herausgebrochen, unter flüssigem Stickstoff in eine Indiumfolie eingeschlagen und so in einen Probenhalter gespannt, daß etwa 1 mm des Probenstückes frei hervorragte (Abb. 8).

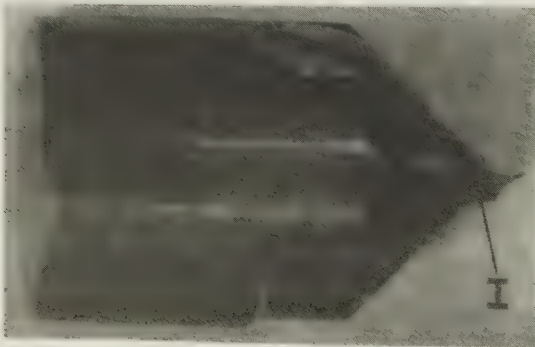


Abb. 8: Gewebestück im Probenhalter. I = Indiumfolie

Zur Befestigung des Gewebestückchens im Präparathalter wurde Indiumfolie verwendet, da diese selbst bei Temperaturen um -200°C noch eine ausreichende Plastizität aufweist, um Unebenheiten von Gewebe und Probenhalter auszugleichen (Rick et al., 1982). Der Probenhalter wurde danach unter Flüssigstickstoff in ein Kryotom (Reichert OmU3) überführt. Dieses Ultramikrotom war mit einem umgebauten Gefrierzusatz ausgestattet, wodurch der Messerhalter und der Schneidearm gekühlt werden konnten. Die Kühlung erfolgte indirekt durch das Einblasen von gasförmigen Stickstoff (-160°C) in Vorratsgefäße, die mit dem Messerhalter und dem Schneidearm durch Kupferstreifen verbunden waren. Die Temperaturen am Schneidearm und Messerhalter wurden auf -110 bzw. -80°C eingestellt, was sich als optimal für das Anfertigen von Semidünnschnitten zwischen 0.5 und $1.5\text{ }\mu\text{m}$ für die Röntgenstrahlmikroanalyse erwiesen hatte (Dörge et al., 1978). Der Schneidevorgang stellt bei diesen Temperaturen eher einen kontinuierlichen "Breachvorgang" dar (Kirk und Dobbs, 1976; Saubermann et al., 1977), wodurch das Herstellen der Kryoschnitte relativ schwierig war und häufig Bruchlinien in den Schnittpräparaten zu erkennen waren (vergl. Abb. 17). Für die Qualität der Harnblasenschnitte waren außer der niedrigen Schneidetemperatur sowohl die Winkелеinstellung des Messers als auch die Schneidegeschwindigkeit entscheidend. Bei Verwendung eines Stahlmessers (Pabisch, München) betrug der Schnittwinkel des Messers 38 bis 40° , der Freiwinkel zwischen Schnittebene und Messerfläche 8 bis 10° . Als optimal erwies sich eine Schneidegeschwindigkeit von nur 0.1 bis 0.2 mm/sek. Dadurch konnte die Wahrscheinlichkeit des Auftauens der Schnitte aufgrund der beim Schneidevorgang freigesetzten Wärme (Hodson und Marshall, 1970 und 1972) deutlich verringert werden. Eine bessere Schnittqualität wurde ebenfalls durch

Entfernen von harten Bindegewebsanteilen aus der Probe erreicht. Die Abbildung 9 skizziert die einzelnen Schritte der Schneidetechnik. Der in der Halterung des Schneidearms befestigte Probenhalter mit dem zu schneidenden Gewebestück bewegt sich kreisförmig von oben nach unten relativ zum feststehenden Messer. Das Messer kann sowohl seitwärts als auch nach vorne bewegt werden. Die Schnittdicke wird mittels eines Mikrometertriebes über den Vorschub reguliert.

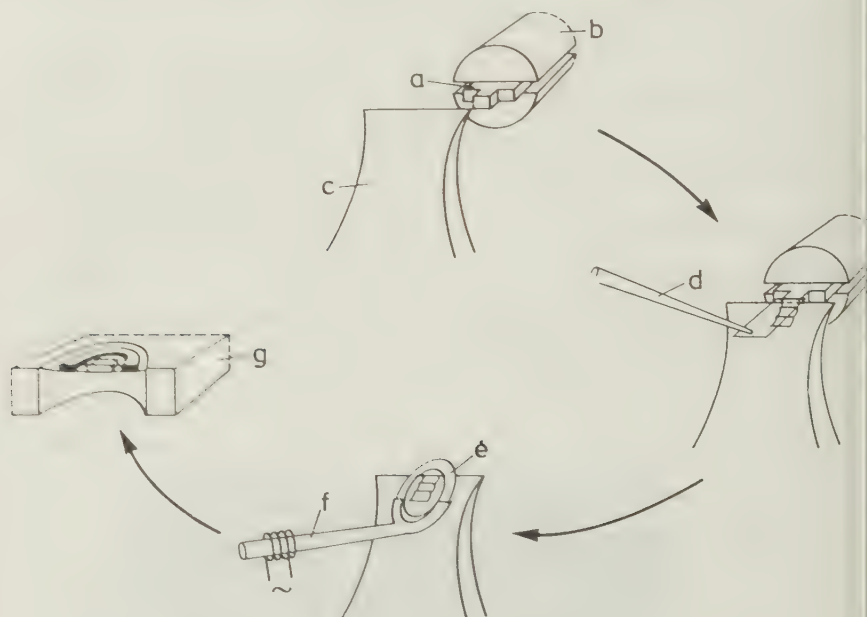


Abb. 9. Gefrierschneiden. a = Gewebestück; b = Probenhalter; c = Stahlmesser; d = Anti-Aufroll-Plättchen; e = Nickelblende; f = elektromagnetischer Manipulator; g = Probentisch zur Ablage der Nickelblenden.

Ein geschliffenes Glasplättchen verhinderte das Aufrollen der etwa $1\text{ }\mu\text{m}$ dicken Serienschnitte. Es wurde mit Hilfe eines Mikromanipula-

tors (Leitz) so über der Schneidekante des Messers positioniert, daß die Schnitte durch einen Spalt zwischen Glasplättchen und Messerkante gleiten konnten. Das Glasplättchen ermöglichte zudem das Verschieben der Schnitte von der Messerkante weg auf den Messerrücken. Von dort konnten die Schnitte besser mit Hilfe von Nickelblenden (Veco, Eerbeek, Holland; Außendurchmesser 3 mm), deren schlitzförmige Öffnung (1 x 2 mm) mit einer Formvarfolie überzogen war, aufgenommen werden. Zu diesem Zweck wurden die Blenden mit Hilfe eines elektromagnetischen vorgekühlten Stabes über die Schnitte gebracht und diese unter leichtem Druck an die Folie der Blenden geheftet. Die Nickelblenden mit den anhaftenden Schnitten wurde anschließend auf einer Probenbühne abgelegt, deren Bohrungen mit einer Kollodiumfolie überspannt war.

Die Formvar- und Kollodiumfolien wurden in üblicher Weise hergestellt (Reimer, 1967). Abweichend davon wurde eine etwas höhere Kollodiumkonzentration verwendet (5 % in Amylacetat). Die Dicke der Folien betrug 100 bis 150 nm.

Die mit 8 - 12 Nickelblenden bestückte Bühne wurde mit einem vorgekühlten Metalldeckel versehen und in eine Gefriertrocknungsanlage (Pfeiffer, TCP 100) überführt. Die Schnitte wurden bei -80°C und 10^{-6} Torr über Nacht gefriergetrocknet. Vor dem Öffnen der Gefriertrocknungsanlage wurden die Schnitte auf Zimmertemperatur erwärmt, um beim Aufheben des Vakuums eine Rehydratation des leicht hygroskopischen Gewebes zu vermeiden. Die auf der Lochbühne liegenden Nickelblenden wurden mit Hilfe eines MiniaturlötKolbens vorsichtig ausgeschnitten und anschließend sofort zum Messen in das Elektronenmikroskop überführt.

3.3.3 Röntgenmikroanalyse der Harnblasenschnitte

3.3.3.1 Prinzip der Elektronenstrahlmikroanalyse

Die Elektronenstrahlmikroanalyse beruht auf dem physikalischen Grundprinzip, daß die Bestrahlung von Materie mit schnellen Elektronen zur Emission von Röntgenstrahlen führt. Bei der Röntgenstrahlung können zwei Anteile unterschieden werden: die sogenannte "weiße Strahlung" mit einem kontinuierlichen Frequenzspektrum und die sogenannte "elementcharakteristische Strahlung" mit einem Linienspektrum.

Der erste Anteil resultiert aus dem Abbremsen der Elektronen im Coulomb-Feld des Atomkernes, wobei ein Teil ihrer kinetischen Energie verloren geht und in Form der sogenannten "weißen Röntgenstrahlung" (Bremsstrahlung) abgegeben wird. Ist die Energie der einstrahlenden Elektronen größer als die notwendige Ionisierungsenergie der angeregten Atome, so können Elektronen innerer Orbitale herausgeschlagen werden (Abb. 10). Bei dem Auffüllen der entstandenen Lücken durch die Elektronen äußerer Schalen werden Röntgenquanten emittiert, deren Energiebeträge den Differenzen der Energieniveaus der jeweiligen Schalen entsprechen und damit charakteristisch für die angeregten Elemente sind. Die Strahlung, die bei dem Übergang eines Elektrons von der L- zur K-Schale frei wird, bezeichnet man als K_{α} -Strahlung und die, die beim Übergang von der M- zur K-Schale frei wird, als $K\beta$ -Strahlung, usw. Während die Intensität der charakteristischen Strahlung ein Maß für die Elementkonzentration darstellt, entspricht die Bremsstrahlung dem Massengehalt im angeregten Probenvolumen.

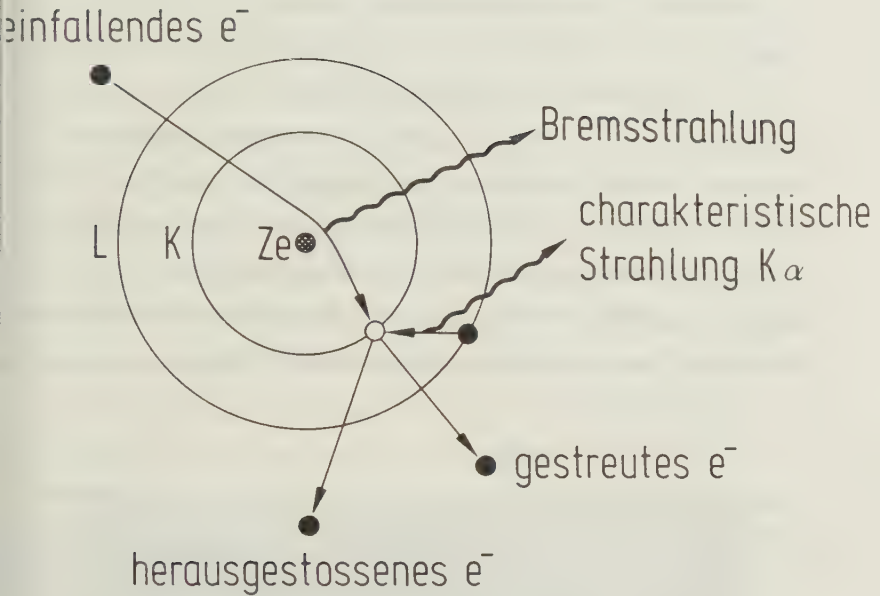


Abb. 10: Anregung von elementcharakteristischer Röntgenstrahlung und Bremsstrahlung. e^- = Elektron.

Durch die Kombination eines Elektronenmikroskopes mit einem Röntgen-nachweissystem können Elementanalysen in Mikrovolumina, z.B. in einzelnen Zellen oder sogar subzellulären Strukturen, durchgeführt werden.

3.3.3.2 Analyse der Gewebeschnitte

Die Röntgenmikroanalyse der Gewebeschnitte erfolgte in einem Raster-elektronenmikroskop (Stereoscan S4, Cambridge Instruments), welches mit einem energiedispersiven Röntgendetektor (National Semiconductor, Link Systems) ausgerüstet war.

Die Abbildung 11 veranschaulicht das Prinzip des Röntgennachweissystems und der Objektabbildung. Die durch den Elektronenstrahl der Sonde in den Schnitten generierten Röntgenstrahlen erzeugen in dem Detektor (Si-Li-Halbleiter) Stromimpulse, deren Höhe proportional der Energie der auftreffenden Röntgenquanten ist. Mit Hilfe eines Impulshöhenanalysators und eines Vielkanalspeichers wird ein energiedispersives Röntgenspektrum aufgenommen, dessen Linien den einzelnen Elementen (elementcharakteristische Strahlung) und dessen Untergrund dem Massengehalt der Probe (weiße Strahlung) entsprechen.

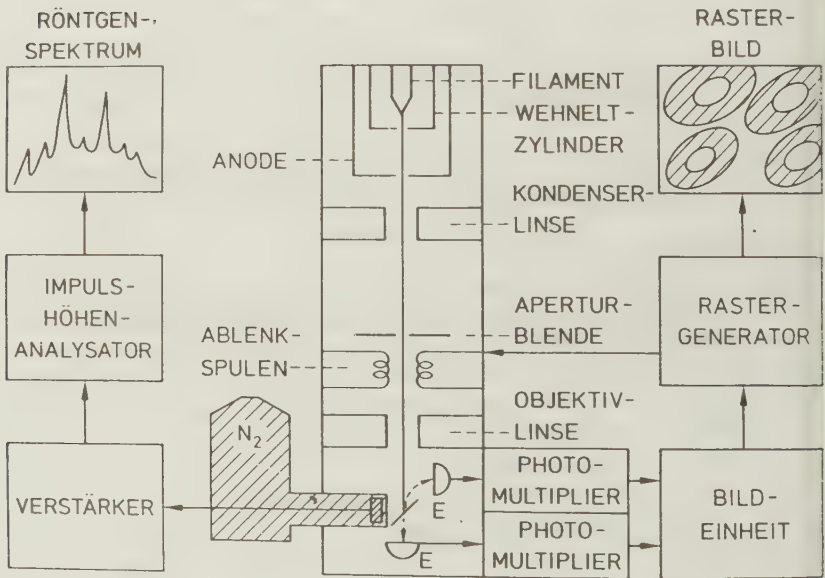


Abb. 11: Prinzip der Elektronenstrahlmikroanalyse. N₂ = flüssiger Stickstoff; E = Elektronendetektor; weitere Erläuterungen siehe Text.

Abbildung 12 zeigt die für die Messungen verwendete Probenbühne. Die Bühne ist aus reinstem Graphit gefertigt, um die Fremdstrahlung, die durch gestreute Elektronen in Bauteilen der Probenkammer generiert wird, möglichst gering zu halten (Rick et al., 1982). Die Bühne ist um eine zentrale Achse drehbar und enthält 20 größere durchgehende Bohrungen, über die die Nickelblenden mit den Schnitten abgelegt werden. Diese räumliche Anordnung führt dazu, daß die von den transmittierten Elektronen in den Bestandteilen der Probenkammer angeregte Röntgenstrahlung vom Detektor nicht erfaßt werden kann. Die Bühne ist elektrisch isoliert aufgebaut und über einen Kontaktschleifer mit dem Eingang eines Probenstrommeßgerätes verbunden.

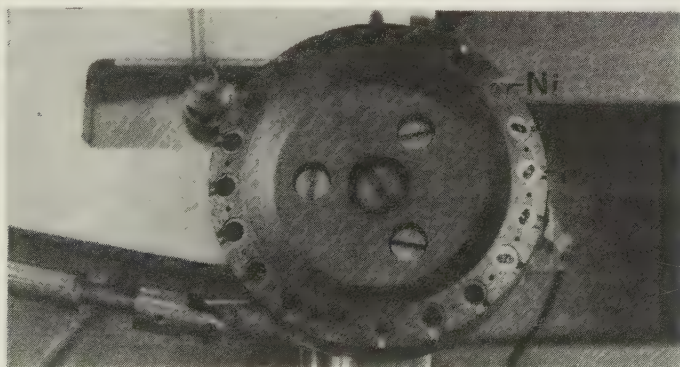


Abb. 12: Probenbühne. F = Faraday-Käfig zur Probenstrommessung; Ni = Nickelblende mit Präparat.

Zur Probenstrommessung wird der Elektronenstrahl in einer von 20 kleineren Bohrungen (0.1 mm Durchmesser) justiert. Diese Bohrungen (Faraday-Käfige) sind nach unten abgeschlossen und liegen jeweils zwischen den größeren Bohrungen zur Ablage der Blenden.

Seitlich über der Bühne ist der Röntgendetektor angebracht, der sich hinter einem Berylliumfenster (etwa 8 μm dick) in einem getrennten

Vakuumsystem befindet (Abb. 13). Der Tubus, in dem sich der Detektor befindet, ist beweglich, so daß er während der Messung bis auf 7 mm an die Probe herangebracht werden kann, um die generierte Röntgenstrahlung unter einem möglichst großen Raumwinkel zu erfassen. Die Bühnenoberfläche ist 15° zum Detektor hin geneigt.

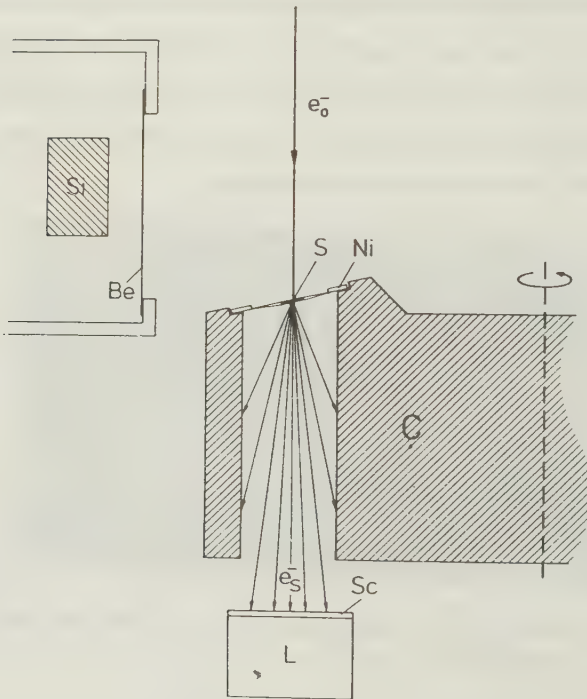


Abb. 13: Räumliche Anordnung von Probe und Detektor.

e_o^- = anregender Elektronenstrahl

e_s^- = transmittierte Elektronen

S = Schnitt

Ni = Nickelblende

Si = Si-Li-Detektor

Be = Beryllium-Fenster

C = Probenbühne aus Kohlenstoff (Graphit)

Sc = Szintillatorplättchen

L = Lichtleiter zum Photomultiplier

Die Objektabbildung erfolgt über einen unterhalb der Bühne angebrachten Elektronendetektor. Die auf ein Plastikszintillatorplättchen auftreffenden transmittierten Elektronen lösen Lichtblitze aus, die über einen Lichtleiter zu einem Photomultiplier weitergeleitet werden. Das auf diese Weise gewonnene Rastertransmissionsbild ist dem Reflexionsbild, welches über einen sich oberhalb der Probenbühne befindlichen Elektronendetektor (vergl. Abb. 11) aufgenommen wird, an Kontrast weit überlegen. Vor Beginn der Messungen wurde von jedem Schnitt ein Polaroidübersichtsphoto erstellt, um die Meßpositionen morphologisch zuordnen zu können. Für die Analyse wurde ein reduziertes Rasterfeld verwendet, mit welchem die zu untersuchenden Strukturen, wie Albumin, Zellkern oder Zytoplasma, abgerastert wurden. Die Größe des Rasterfeldes von durchschnittlich $1 \times 1 \mu\text{m}$ war groß genug gewählt, um eventuelle Inhomogenitäten in der Elementverteilung aufgrund von Eiskristallbildung ausgleichen zu können. Außerdem war nachgewiesen worden, daß die laterale Auflösung der verwendeten Meßapparatur sicher unter $0.6 \mu\text{m}$ liegt (Rick et al., 1982). Um die Anregung von extrazellulären Räumen zu vermeiden, wurde bei zellulären Messungen ein Mindestabstand von $0.5 \mu\text{m}$ zu den Interzellularspalten gehalten. Durch den Rasterbetrieb während des Meßvorganges war eine visuelle Überwachung der Meßpositionen möglich, so daß Verschiebungen oder Kontaminationen der Schnitte sofort erkannt werden konnten. Kontaminationen können bei der Elektronenstrahlmikroanalyse zu einer scheinbaren Massenzunahme (erhöhte Bremsstrahlung) oder zu einer Verunreinigung mit bestimmten Elementen (Chlor und Schwefel) führen. Diese Verunreinigung ist bedingt durch die Polymerisation von Kohlenwasserstoffmolekülen, welche aus dem Vakuum der Kammer (Verunreinigung durch eingefettete Gummidichtungen oder Diffu-

sionspumpenöl) oder aus der Probe selbst stammen können. Durch bestimmte Kühlvorrichtungen in der Kammer (vergl. Abb. 11) können Kontaminationen der Schnitte reduziert werden (Agar et al., 1974; Harada et al., 1979; Sutfin, 1976). Unter normalen Analysebedingungen wurde kein Hinweis für Kontaminationen der Schnittpräparate erhalten. Die Messungen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV und einem Probenstrom von 0.3 nA durchgeführt. Die Meßzeit betrug 100 sek. Nach jeder Messung wurde der Probenstrom (siehe oben) überprüft. Dies war erforderlich, da selbst geringfügige zeitliche Änderungen des Probenstroms, wie sie vor allem nach Kathodenwechsel vorkommen können, die Zählrate beeinflussen.

Nach den Messungen wurden die erhaltenen Vielkanalspektren (1024 Kanäle) in eine angeschlossene Rechenanlage (Data General, Eclipse S230) überspielt und dort gespeichert.

3.3.4 Auswertung der Spektren

Die Auswertung der Spektren erfolgte in einer Rechenanlage mit Hilfe eines speziellen Auswertprogrammes (Bauer und Rick, 1978). Das Grundprinzip dieses Programmes besteht in einer Anpassung eines vom Rechner berechneten Spektrums an das gemessene Spektrum und in der Trennung der elementcharakteristischen Strahlung von der "weißen Strahlung", dem Spektrenuntergrund (Bremsstrahlung), wobei die physikalischen Gesetzmäßigkeiten der Röntgenanregung und Röntgenabsorption und die Eigenschaften der verwendeten Röntgennachweisapparatur berücksichtigt werden. Die Abbildung 14 veranschaulicht am Beispiel eines zellulär gemessenen Spektrums das Verfahren einer solchen Auswertung.

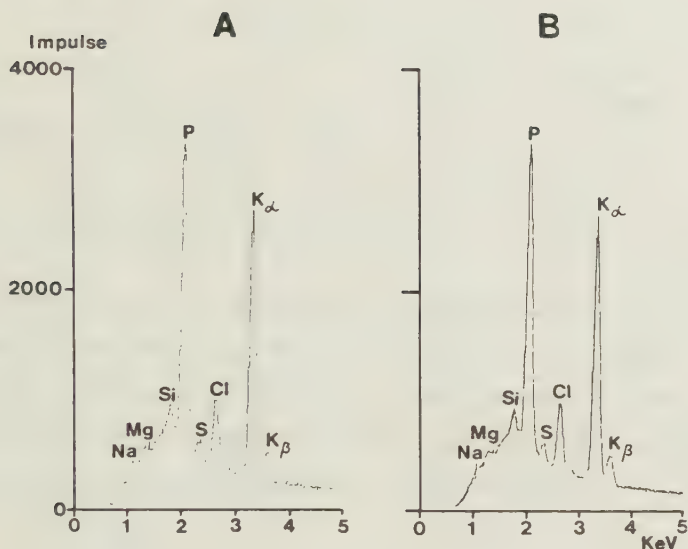


Abb. 14: Gemessenes Spektrum (A) und vom Computer angepaßtes Spektrum (B) einer Epithelzelle. In dem dargestellten Energiebereich (0 - 5 keV) liegen die K α - und (K β -) Linien der Elemente Na, Mg, Si, P, S, Cl und K.

5. Quantifizierung der Elementkonzentrationen

Die Quantifizierung der zellulären Elementkonzentrationen bezogen auf das Feuchtgewicht erfolgte über den Vergleich der elementcharakteristischen Linienintensitäten im Gewebe mit denen im aufgetragenen Albuminstandard (Abb. 15). Aus dem Vergleich von "weißer Strahlung" im Gewebe und Standard ließen sich außerdem die lokalen Gewebetrockengewichte berechnen, so daß die Konzentrationen der Elemente auch auf das Trockengewicht oder auf das Zellwasservolumen bezogen werden konnten.

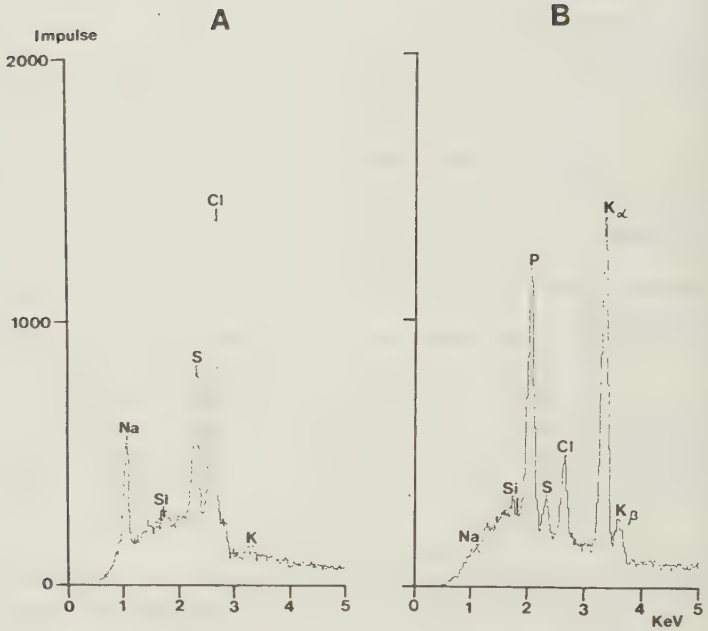


Abb. 15: Die Spektren A und B wurden, durch das Abrastern eines Feldes in dem Albuminstandard (A) und eines in der gleichen Höhe befindlichen Feldes in dem Zellkern einer Granularzelle (B) aufgenommen. In dem dargestellten Energiebereich (0 - 5 keV) liegen die K_{α} - und (K_{β} -) Linien der Elemente Na, Si, P, S, Cl und K.

Die Konzentrationen der Elemente Natrium und Chlor, die in ausreichender Konzentration im Standard enthalten sind, wurden aus dem Intensitätsverhältnis der Natrium- bzw. Chlorstrahlung in Gewebe (G) und Standard (S) multipliziert mit der bekannten Natrium- bzw. Chlorkonzentration der Albuminringperlösung berechnet.

Es ergibt sich folgende Gleichung:

$$\text{Konz.}_G^a = \frac{\text{Zählrate}_G^a}{\text{Zählrate}_S^a} \times \text{Konz.}_S^a$$

(a = zu bestimmende Elemente, Na oder Cl)

Die Konzentrationen von Elementen, wie Kalium oder Phosphor, die im Standard nicht oder nur in geringer Konzentration vorliegen, wurden indirekt über den Vergleich mit der charakteristischen Strahlung von Chlor im Standard bestimmt. Die Gleichung zur Bestimmung der Konzentrationen dieser Elemente (Phosphor oder Kalium) lautet:

$$\text{Konz.}_G^b = \frac{\text{Zählrate}_G^b}{\text{Zählrate}_S^{\text{Cl}}} \times \text{Konz.}_S^{\text{Cl}} \times \alpha$$

(b = zu bestimmende Elemente, P oder K)

Durch den Proportionalitätsfaktor (α) werden hierbei die Unterschiede in der Röntgenausbeute der verschiedenen Elementlinien im Gewebe und der Chlorlinie des Standards berücksichtigt (Rick et al., 1979).

Das Trockengewicht des Gewebes wurde aus der Untergrundstrahlung ("weiße Strahlung", WS) der Spektren von Gewebe und Standard und dem bereits bekannten Trockengewicht des Standards (vergl. 3.2) ermittelt:

$$\text{Trockengewicht}_G = \frac{\text{Zählrate}_{GWS}}{\text{Zählrate}_{SWS}} \times \text{Trockengewicht}_S$$

Für das in dieser Arbeit angewandte Quantifizierungsverfahren müssen einige wesentliche Voraussetzungen erfüllt sein, die im Folgenden diskutiert werden.

Durch das Auftragen der Albuminstandardringerlösungen auf die Epithelseite wurde der Funktionszustand der Blasen nicht beeinflusst, da das Gewebe diesen Lösungen nur wenige Sekunden vor dem Einfrieren ausgesetzt war (vergl. 3.3.2).

Die Intensität der charakteristischen Strahlung eines Elementes hängt vor allem von der Flächendichte der Atome ($N/\mu\text{m}^2$) ab. Bei der hier angewandten Röntgenanalyse von Gewebsschnitten ergibt sich dieser Wert unmittelbar aus dem Produkt von Schnittdicke (μm) und Volumenkonzentration eines Elementes ($N/\mu\text{m}^3$). Bei gleicher Schnittdicke von Probe und Standard entspricht das Verhältnis der Linienintensitäten eines Elementes ($I_{\text{Probe}}/I_{\text{Standard}}$) dem Verhältnis der Volumenkonzentrationen ($K_{\text{Probe}}/K_{\text{Standard}}$). Nach der Probenkonzentration aufgelöst gilt:

$$K_{\text{Probe}} = (I_{\text{Probe}}/I_{\text{Standard}}) \times K_{\text{Standard}}$$

Da der Albuminstandard in seinem Trockengewichtsanteil und seiner groben Elementzusammensetzung weitgehend der Probe entspricht und beide etwa ein spezifisches Gewicht von 1 (gleich spezifisches Gewicht von biologischen Weichgeweben) aufweisen, können die Volumenkonzentrationen als Feuchtgewichtskonzentrationen verstanden werden.

Die Voraussetzung der gleichen Schnittdicke von Gewebe und Standard ist im wesentlichen dadurch erfüllt, daß die Albuminlösung unmittelbar auf die Epithelseite des Präparates aufgetragen wurde und als dünne Schicht während des Schneidens erhalten blieb. Um eventuell auch innerhalb eines Schnittes auftretende Dickenunterschiede auszugleichen, wurde die Probe beim Schneiden immer so ausgerichtet, daß die Blasenoberfläche mit der anhaftenden Albuminschicht senkrecht zur Schneidekante stand (Abb. 16). Bei der Quantifizierung wurden außerdem nur Gewebs- und Standardspektren miteinander verglichen, die auf gleicher Schnitthöhe erhalten worden waren. Durch dieses Verfahren konnte die Streuung der Meßwerte deutlich verringert werden.

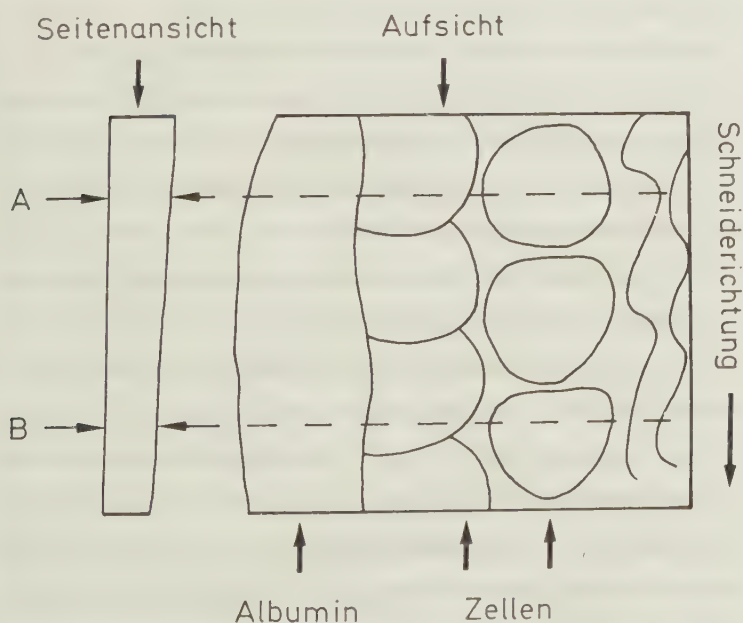


Abb. 16: Orientierung der Harnblase relativ zur Schneiderichtung. Bei der Quantifizierung werden Messungen in den Zellen mit Messungen in der Albuminschicht auf gleicher Höhe (z.B. auf der Höhe A oder B) verglichen.

Neben der gleichen Schnittdicke von Gewebe und Standard setzt das Quantifizierungsverfahren weiter voraus, daß das Volumen von Probe und Standard durch das Präparationsverfahren nicht oder wenn, dann in gleichem Ausmaß verändert wird. Nach den Untersuchungen von Ingram und Mitarbeitern (1974) unterliegen Weichgewebe während des Gefriertrocknens einer etwa gleich großen Schrumpfung (ca. 20%) wie Albuminlösungen mit vergleichbarer Trockengewichtskonzentration. Mögliche Unterschiede in der Schrumpfung sollten zudem bei Schnitten in erster Linie die Höhe betreffen (Appleton, 1978), so daß die für die Quantifizierung relevante Flächenkonzentration der Elemente ($N/\mu\text{m}^2$) weitgehend unverändert bleibt.

Eine wesentliche Erleichterung für die Quantifizierung der Elementkonzentrationen stellt die Verwendung von Schnitten dar, die im Sinne der Elektronenstrahlmikroanalyse als "dünn" bezeichnet werden können, d.h. bei denen die Röntgenausbeute durch die Matrixzusammensetzung kaum beeinflußt wird. Dies setzt die Wahl einer entsprechend hohen Beschleunigungsspannung im Verhältnis zur Schnittdicke voraus (Hall, 1971 und 1975). Für die Röntgenanalyse von 1 μm dicken gefriergetrockneten Schnitten biologischer Weichgewebe ist eine Beschleunigungsspannung von 20 kV (vergl. 3.3.3.2) hoch genug gewählt, um die Abbremsung der Elektronen im Gewebe möglichst klein zu halten und so innerhalb der Schnitte gleichbleibende Ionisierungsquerschnitte zu erhalten. Ein weiterer Vorteil von dünnen Schnitten ist, daß die Absorption der Röntgenstrahlen (Selbstabsorption) innerhalb der Probe vernachlässigt werden kann. Selbst für Natrium, das auf Grund der niedrigen Energie der $K\alpha$ -Linie ($E = 1.041 \text{ keV}$) von allen interessie-

renden Elementen am stärksten absorbiert wird, beträgt die Selbstabsorption nur etwa 5 % (Rick et al., 1979). Sind die oben angeführten Voraussetzungen erfüllt, so hängt die Intensität der elementcharakteristischen Strahlung bei konstanten Meßbedingungen linear von den Elementkonzentrationen ab. Gleiche Meßbedingungen wurden durch die fortwährende Kontrolle von Probenstrom, Beschleunigungsspannung und Meßzeit sichergestellt (vergl. 3.3.3.2).

Für die Messungen wurde ein Probenstrom von nur 0.3 nA angewandt, um den Massenverlust möglichst klein zu halten. Dieser Massenverlust wird dadurch bedingt, daß bei dem Elektronenbeschuß von biologischen Präparaten chemische Verbindungen aufbrechen und leicht flüchtige Radikale verloren gehen. Der Verlust der Radikale führt zu einer teilweisen Verkohlung der biologischen Matrix (König und Winkler, 1948; Bahr et al., 1965). Somit beschränkt sich der Massenverlust im wesentlichen auf die Elemente der biologischen Matrix, wie Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel. Für die hier durchgeführten Messungen bedeutet dies, daß die Bremsstrahlung (weiße Strahlung) um ca. 20 % absinkt und auch die Zählrate für Schwefel abfällt. Die charakteristische Strahlung für Natrium, Chlorid und Kalium bleibt jedoch konstant (Rick et al., 1979). Da der Massenverlust in Probe und Standard auf Grund der ähnlichen Zusammensetzung in etwa gleich groß ist und die Quantifizierung auf einem Vergleich beruht, sollten sich jedoch auch bei der Bestimmung des Trockengewichtes keine größeren Fehler ergeben.

3.3.6 Statistik

Die Elementkonzentrationen in der Zelle werden in mmol/kg Feuchtgewicht (F.G.) angegeben und die Trockengewichte in g/100 g Feuchtgewicht.

Die Ergebnisse der Einzelmessungen (n = Anzahl der Messungen) in den verschiedenen Zelltypen des Blasenepithels werden für die einzelnen Versuchbedingungen jeweils als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben und mit Hilfe des Student t-Tests auf signifikante Unterschiede ($2P < 0.05$) hin untersucht. Die Meßwerte waren im allgemeinen normal verteilt. Allerdings reichte in einigen Fällen (z.B. in den Basalzellen oder mitochondrienreichen und schleimproduzierenden Zellen) die Anzahl für einen exakten statistischen Vergleich nicht aus. Die Abbildungen enthalten als Fehlerangabe die einfache Standardabweichung des Mittelwertes.

ERGEBNISSE

Identifizierung der verschiedenen Zelltypen des Blasenepithels

Die Wand der Blase ist aus drei Schichten aufgebaut, dem mukösen Epithel, der unterstützenden Submucosa und einer Lage seröser Zellen. Anteilmäßig überwiegt die Submucosa, ein Bindegewebe, welches aus einem lockeren Geflecht kollagener Fasern mit verstreut angeordneten Blutgefäßen, Nervenfasern und Strängen glatter Muskulatur besteht. Einige dieser Strukturen sind in der Rastertransmissionsaufnahme eines etwa 1 μm dicken gefriergetrockneten Kryoschnittes der Harnblase (Abb. 17) zu erkennen. Auf der serosalen Seite wird die Submucosa von einer dünnen Lage mesothelialer Zellen, der Serosa, begrenzt, die hier allerdings nicht abgebildet ist.

In der vorliegenden Arbeit interessierte vor allem das für den Natriumtransport verantwortliche Epithel. Das zweireihige Epithel bedeckt die mukosale oder luminale Seite der Harnblase und ist je nach Dehnungsgrad des Organs zwischen 2 und 10 μm dick. Zur Submucosa hin wird das Epithel durch eine dünne Basalmembran (Pfeil in Abb. 17) begrenzt. Die mit antidiuretischem Hormon (AVP) oder Aldosteron behandelten Harnblasenhälften zeigten dieselbe histologische Struktur wie die hier abgebildete Kontrollblase. Auch die Vorinkubation der Versuchstiere in Kochsalzlösungen (vergl. 3.1) führte zu keinen beobachtbaren Veränderungen im histologischen Bild.



Abb. 17: Rastertransmissionsaufnahme eines gefriergetrockneten Kryoschnittes der Krötenharnblase (etwa 1 μm dick) zusammen mit einer Skizze der verschiedenen Epithelzelltypen (GR = Granularzellen, BA = Basalzellen, MR/GO = mitochondrienreiche/-goblet cells-) Zellen). Der Balken entspricht 5 μm .

Zahlreiche licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß das Epithel aus drei (Schiefferdecker, 1884; List, 1887; Keller, 1960 und 1963) bzw. vier (Choi, 1963) verschiedenen Zelltypen zusammengesetzt ist. Die Identifizierung dieser Zellen gestaltet sich bei der Analyse von gefriergetrockneten Kryoschnitten jedoch relativ schwierig, da die zelluläre Feinstruktur beim Einfrieren durch die

Bildung von Eiskristallen zerstört wird. Aus dem Rastertransmissionsbild wird ersichtlich, daß hier nicht auf Unterscheidungskriterien, wie die Anzahl endoplasmatischer Einschlüsse oder Mitochondrien, zurückgegriffen werden kann, welche bei konventionellen Fixierungs- und Färbeverfahren zur Verfügung stehen. Dennoch konnten die Zelltypen im wesentlichen aufgrund ihrer Gestalt und Lage innerhalb des Epithels identifiziert werden (vergl. Abb. 17).

Bei *Bufo marinus* besteht das Harnblasenepithel zu über 70 Prozent (Keller, 1963; DiBona et al., 1969 a und b; Danon et al., 1974) aus den sogenannten Granularzellen (GR), welche sich zur mukosalen Seite hin verbreitern. Die Granularzellen haben in ihrer Gesamtheit einen Anteil von fast 98 % an der luminalen Oberfläche des Epithels (Leaf, 1965; DiBona et al., 1969 a und b). Neben den Granularzellen findet man vereinzelt Zellen, die ein wenig größer sind und eine "flaschenförmige" Gestalt aufweisen. Es handelt sich hierbei entweder um mitochondrienreiche Zellen (MR, wenig unterhalb der Bildmitte in Abb. 17) oder um schleimproduzierende Zellen (goblet cells, GO, hier nicht abgebildet), die zusammen bis zu 20 % des Epithelvolumens ausmachen. Ihre apikale Membranfläche nimmt jedoch nur 2 bis 3 % der Gesamtoberfläche des Epithels ein (Leaf, 1965). Die Schleimzellen können normalerweise anhand elektronenoptisch dichter Einschlüsse (Schleimvesikel) im apikalen Zytoplasmabereich von den mitochondrienreichen Zellen unterschieden werden. Da sie bei Langzeitversuchen jedoch dazu neigen, den Schleim zu sezernieren (DiBona et al., 1969b) und selten der für die mitochondrienreichen Zellen charakteristische Mikrovilliensaum so ausgeprägt war wie in der vorliegenden Abbildung, war eine morphologische Unterscheidung meist kaum möglich. Deshalb wurde auf eine getrennte Analyse dieser Zelltypen verzichtet und beide wurden

zu einer Gruppe (MR/GO) zusammengefaßt. Die Berechtigung hierfür ergab sich aus den relativ ähnlichen Elementkonzentrationen dieser Zelltypen. Auffällig waren insbesondere ihre niedrigen Chlorkonzentrationen. Auch die Basalzellen waren bei dem hier angewandten Präparationsverfahren schwer zu erkennen, da sie meist sehr flach und lang gestreckt in der Nähe der Basalmembran lagen und die kleinen ungefärbten Kerne optisch kaum hervortraten. Weiterhin ist in der Aufnahme oberhalb des Epithels die als interner Standard aufgetragene Albuminschicht zu erkennen.

Die Abbildung 18 zeigt charakteristische energiedispersive Röntgenspektren der verschiedenen Epithelzellen unter Kontrollbedingungen.

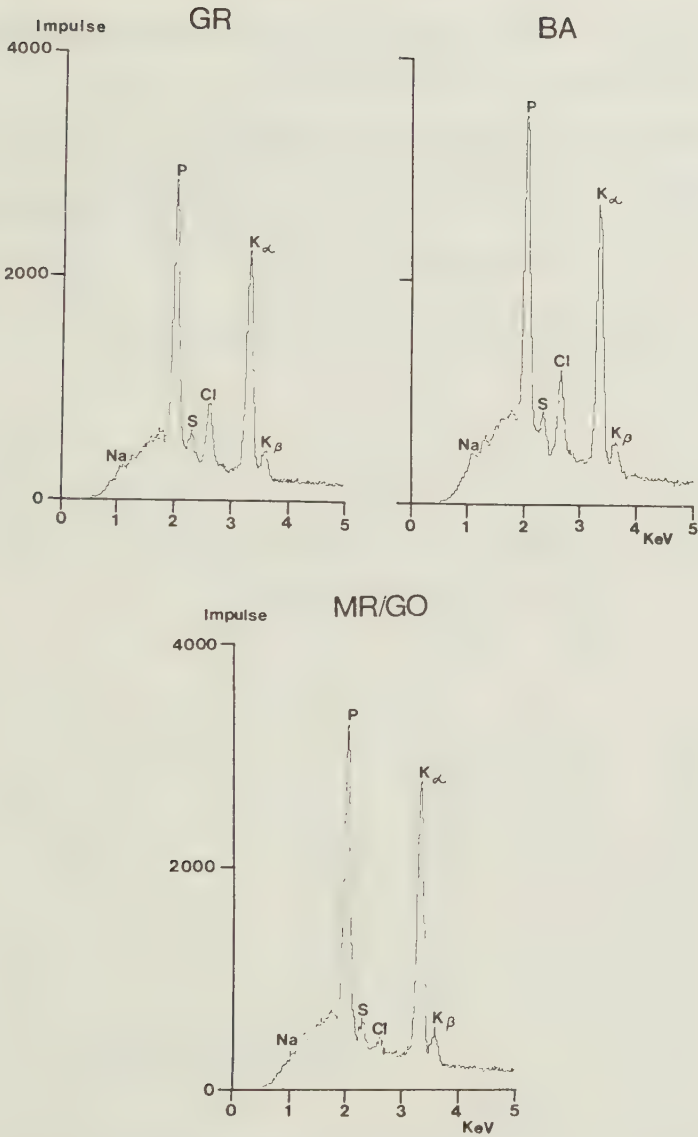


Abb. 18: Energiedispersive Röntgenspektren der verschiedenen Epithelzelltypen (GR = Granularzellen, BA = Basalzellen, MR/GO = mitochondrienreiche/schleimproduzierende (-goblet cells-) Zellen) unter Kontrollbedingungen. Die Linien der interessierenden Elemente (Na, P, S, Cl und K) sind gekennzeichnet.

Aus dem Vergleich der Spektren geht bereits hervor, daß die Zelltypen sich vor allem hinsichtlich der Natriumwerte und dem Verhältnis ihrer Schwefel- und Chlorkonzentrationen voneinander unterscheiden. Umgerechnet in mmol/kg Feuchtgewicht (F.G.) ergaben sich für die hier gezeigten einzelnen Zellen die in der Tabelle 1 zusammengestellten wichtigsten Elementkonzentrationen. Die Werte für Schwefel müssen wegen des wahrscheinlich auftretenden Massenverlustes (vergl. 3.3.5) als Mindestwerte betrachtet werden.

Tab. 1: Elementkonzentrationen (mmol/kg F.G.) in den verschiedenen Epithelzellen (GR = Granularzellen, BA = Basalzellen, MR/GO = mitochondrienreiche/schleimproduzierende (-goblet cells-) Zellen) unter Kontrollbedingungen

	Na	P	S	Cl	K
GR	11	151	19	35	128
BA	18	147	17	35	112
MR/GO	5	148	12	9	124

Elementkonzentrationen im Kern und Zytoplasma

In der Tabelle 2 sind die Elementkonzentrationen und Trockengewichte im Kern und Zytoplasma von Granularzellen unter drei verschiedenen experimentellen Bedingungen dargestellt.

Tab. 2: Elementkonzentrationen und Trockengewichte im Kern und Zytoplasma.

	Na	K	Cl	P	Ca	TG
	mmol/kg F.G.					g/100 g
Kontrolle (n=17)						
- Kern	7.5 _±	124.0 _±	32.5 _±	146.3 _±	0.2 _±	20.0 _±
	5.3	19.7	9.8	36.5	0.4	4.1
- Zytoplasma	11.0 _±	131.0 _±	41.7 _±	138.5 _±	1.1 _±	22.2 _±
	5.2	26.0	5.7*	52.2	1.1*	3.1
Aldosteron (n=14)						
- Kern	15.1 _±	122.5 _±	39.7 _±	124.6 _±	0.0 _±	23.8 _±
	6.1	11.3	3.7	26.5	0.0	3.1
- Zytoplasma	17.3 _±	111.7 _±	48.4 _±	124.2 _±	1.3 _±	27.5 _±
	6.8	12.6	6.7*	25.3	1.7*	5.1
AVP (n=9)						
- Kern	39.0 _±	107.5 _±	39.3 _±	164.4 _±	0.2 _±	25.7 _±
	10.6	19.3	6.0	19.3	0.3	4.1
- Zytoplasma	41.9 _±	100.3 _±	48.9 _±	141.2 _±	1.8 _±	27.9 _±
	14.2	17.8	8.6*	25.2*	2.1	6.1

Mittelwerte _± Standardabweichung

* signifikant verschieden von dem Kernwert ($2P < 0.05$)

Bei allen Versuchsbedingungen waren die Natrium- und Kaliumkonzentrationen zwischen Kern und Zytoplasma nicht signifikant voneinander verschieden, obwohl die Natriumwerte im Zytoplasma um durchschnitt-

lich 2.6 mmol/kg Feuchtgewicht (F.G.) höher lagen. Für Phosphor und Kalzium, die vorwiegend in gebundener Form vorliegen, zeigten sich hingegen einige statistisch gesicherte Unterschiede zwischen den beiden zellulären Kompartimenten. So war die Phosphorkonzentration nach AVP im Zellkern größer als im Zytoplasma. Unter allen drei Versuchsbedingungen waren zudem im Zytoplasma höhere Kalziumkonzentrationen als im Zellkern nachweisbar. Die im Zellkern um durchschnittlich 9.2 mmol/kg F.G. niedrigeren Chlorkonzentrationen waren in allen Versuchsgruppen signifikant von den Werten des Zytoplasmas verschieden. Für das Trockengewicht ergaben sich bei allen drei experimentellen Bedingungen im Zytoplasma höhere Werte, die sich aber auf Grund der großen Streuung nicht signifikant von den Kernwerten unterschieden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Verteilung der Elemente zwischen Kern und Zytoplasma unter allen Versuchsbedingungen im wesentlichen erhalten blieb. Experimentell induzierte Konzentrationsänderungen der diffusiblen Elemente (Na, K und Cl) betrafen immer beide Zellkompartimente in gleicher Weise. Diese Aussage trifft grundsätzlich auch auf die anderen Zelltypen des Harnblasenepithels zu. Eine Ausnahme bildeten lediglich einige Schleimzellen, die sich trotz einer Versuchsdauer von mehreren Stunden nicht entleert hatten (vergl. 4.1) und in ihrem apikalen Zytoplasma im Bereich der Schleimvesikel deutlich niedrigere Kaliumwerte als im Kern aufwiesen. Die Kalziumwerte waren hier etwas höher als die sonst üblichen Zytoplasmakonzentrationen. Dasselbe Ergebnis zeigten Untersuchungen, die bereits früher mit der Elektronenstrahlmikrosonde an der Krötenharnblase durchgeführt worden waren (Rick et al., 1978a). Da in der Mehrzahl dieser ohnehin seltenen Zellen (vergl. 4.1) keine Schleim-

vesikel mehr vorhanden waren, soll in der vorliegenden Arbeit auf diesen Befund nicht weiter eingegangen werden.

Die im Folgenden angegebenen Konzentrationen stellen bei den Granularzellen Mittelwerte für beide Zellkompartimente dar. Sie beruhen entweder auf Messungen, bei denen das Rasterquadrat etwa gleich große Areale von Kern und Zytoplasma erfaßte oder sie wurden als Mittelwerte von getrennten Messungen in beiden Zellanteilen berechnet. In den Basalzellen wurde vorwiegend im Kern gemessen, da das Zytoplasma meist nur als schmaler Saum vorlag. Auch bei den mitochondrienreichen/schleimproduzierenden Zellen handelt es sich in der Mehrzahl um Kernmessungen, denn hier wurde aufgrund der "flaschenförmigen" Gestalt der Zellen (vergl. 4.1) vor allem im basalen Bereich gemessen, in welchem vorwiegend die Kerne lagen.

4.3 Wirkung von Aldosteron bei Inkubation in pyruvathaltiger Ringerlösung

Bei der anschließenden Darstellung der einzelnen Versuche werden die Änderungen der Elektrolytkonzentrationen, insbesondere die der Natrium- und Kaliumkonzentrationen, bei verschiedenen Funktionszuständen des transepithelialen Natriumtransportes beschrieben. In den Abbildungen werden daher zusammen mit den Daten der Elektronenstrahlmikroanalyse die jeweiligen Kurzschlußstromkurven gezeigt.

Aus den unter 4.1 genannten Gründen reicht die Anzahl der Messungen in den Basal- und mitochondrienreichen/schleimproduzierenden Zellen in vielen Fällen nicht aus, um unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen statistisch gesicherte Aussagen für diese Zelltypen treffen zu können. Sie werden dennoch soweit als möglich mitdargestellt, da sie Aussagen bezüglich der funktionellen Beteiligung dieser Zellen am transepithelialen Natriumtransport zulassen.

Die Abbildung 19 A zeigt den Verlauf einer Kurzschlußstromkurve unter Aldosteron bei Inkubation der Blasen in normaler Ringerlösung. Die Innenbadlösung enthielt Pyruvat (5 mM, vergl. 3.2). Die Kröte war vier Tage vor Versuchsbeginn in 1/2 isotoner Kochsalzlösung gehalten worden, um so den endogenen Aldosteronspiegel auf ein Minimum zu reduzieren (vergl. 3.1).

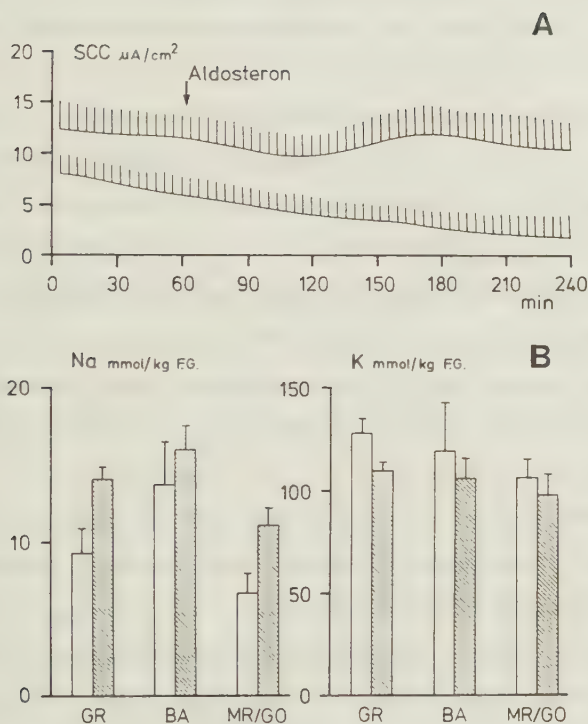


Abb. 19: Die Wirkung von Aldosteron (5.4×10^{-7} M) auf den Kurzschlußstrom (SCC, in A) und die zellulären Na- und K-Konzentrationen (in B) bei einer NaCl-adaptierten Kröte.

- A) Verlauf des SCC unter Aldosteron im Vergleich zur Kontrolle (untere Kurve). Der serosalen Badlösung wurde 5 mM Pyruvat zugefügt. Senkrechte Linien (nicht skaliert) entsprechen der relativen Blasenleitfähigkeit.
- B) Na- und K-Konzentrationen in den verschiedenen Epithelzelltypen (GR = Granularzellen, BA = Basalzellen, MR/GO = mitochondrienreiche/schleimproduzierende (-goblet cells-) Zellen). Offene Säulen = Kontrollwerte, schraffierte Säulen = Aldosteronwerte. Balken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Gegenüber der Kontrollblasenhälfte (untere Kurve), deren Kurzschlußstrom über den Versuchszeitraum kontinuierlich abfiel, reagierte die mit Aldosteron inkubierte Blasen Hälfte nach einer zeitlichen Verzögerung von etwa 60 min nach Hormongabe mit einem geringfügigen Anstieg des SCC von 10.1 auf 12.3 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$.

Neben dem Anstieg des Kurzschlußstromes deutet sich bei Aldosterongabe eine leichte Erhöhung der Leitfähigkeit an (Höhe der Aufstriche), die, wie auch andere Versuche bestätigten, auf die Wirkung des Hormons zurückzuführen ist. Die bei der Kontrolle ab der 180sten Minute zu beobachtende Leitfähigkeitserhöhung muß hingegen als eine geringfügige Verschlechterung des Funktionszustandes dieser Hälfte gewertet werden, denn im allgemeinen änderte sich die Leitfähigkeit unter Kontrollbedingungen auch nach einer Zeit von mehr als 4 Stunden nicht.

Im Mittel von drei Versuchen mit gleichem Versuchsprotokoll (Adaptation der Versuchstiere für 4 Tage in 1/2 isotoner Kochsalzlösung) stieg der Kurzschlußstrom unter Aldosteron von 11.5 auf 18.6 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ an und blieb dann für zwei oder drei Stunden weitgehend unverändert. Die entsprechenden Werte für die Leitfähigkeit waren 0.33 mS/cm^2 zum Zeitpunkt der Hormongabe und 0.41 mS/cm^2 nach einer Inkubationszeit von etwa 3 bis 6 Stunden.

Die Aldosteronantwort konnte auch durch eine sechstägige Adaptation der Tiere in 1/2 isotoner Kochsalzlösung oder für 3 bis 5 Tage in 1/1 isotoner Froschringerlösung nicht vergrößert werden. In den drei Versuchen, in denen die Tiere auf diese Weise extrem NaCl-adaptiert waren, stieg der SCC unter Aldosteron von im Mittel 20.0 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf 37.0 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ an.

Die Wirkung von Aldosteron auf den Natriumtransport der Blase wurde

zusätzlich bei zwei nicht NaCl-adaptierten Kröten untersucht. Bei beiden zeigte der SCC unter Aldosteron über den Zeitraum von etwa 3 Stunden keine nennenswerte Veränderung. Im Gegensatz dazu war bei den Kontrollblasenhälften in der gleichen Zeit ein kontinuierlicher Abfall des SCC auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes zu verzeichnen. Es fiel auf, daß in den beiden Versuchen der SCC und auch die Leitfähigkeit in etwa dem gleichen Maße abfielen, wie diese in den vorherigen Versuchen an Harnblasen von NaCl-adaptierten Tieren anstiegen. Rein rechnerisch ergab sich somit auch bei den nicht NaCl-adaptierten Tieren die gleiche relative Stimulation. Da Aldosteron hier jedoch keine absolute Stimulation des Kurzschlußstromes bewirkte, wurde dieses Modell nicht weiter verfolgt.

Die Abbildung 19 B zeigt die dem oben beschriebenen Einzelexperiment (Abb. 19 A) entsprechenden Daten der Elektronenstrahlmikroanalyse. Nach Aldosteron stiegen die Natriumkonzentrationen in allen Epithelzellen an: in den Granularzellen von 9.3 ± 5.6 (n=12) auf 14.2 ± 3.2 (n=20), in den Basalzellen von 13.7 ± 5.0 (n=2) auf 16.1 ± 4.3 (n=7) und in den mitochondrienreichen/schleimproduzierenden Zellen von 6.8 ± 2.9 (n=4) auf 11.2 ± 3.3 (n=3) mmol/kg Feuchtgewicht. Der Natriumanstieg war nur in den Granularzellen signifikant ($2P < 0.005$). Die Kaliumkonzentrationen zeigten nach Aldosteron reziproke Veränderungen. So sanken die Kaliumwerte in den Granularzellen von 127.6 ± 25.1 auf 109.0 ± 19.9 ($2P < 0.035$), in den Basalzellen von 119.4 ± 46.0 auf 105.5 ± 27.5 und in den mitochondrienreichen/schleimproduzierenden Zellen von 106.6 ± 17.4 auf 97.9 ± 16.6 mmol/kg Feuchtgewicht.

In der Tabelle 3 sind die Mittelwerte für Natrium und Kalium von insgesamt vier Versuchen zusammengestellt, die nach demselben Proto-

Tab. 3: Elementkonzentrationen (mmol/kg F.G.) in den verschiedenen Epithelzellen unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von Aldosteron bei NaCl-Adaptation der Versuchstiere. Die serosale Badlösung enthielt 5 mM Pyruvat.

		Na	K	Cl
Kontrolle				
- GR	(n=63)	10.6 ₊	123.4 ₊	35.3 ₊
		3.7	5.7	7.7
- BA	(n=17)	15.6 ₊	112.5 ₊	33.2 ₊
		9.1	21.9	9.6
- MR/GO	(n=9)	11.4 ₊	114.1 ₊	12.1 ₊
		6.1	14.3	5.8
Aldosteron				
- GR	(n=49)	12.3 ₊	116.9 ₊	31.4 ₊
		5.0	25.9	8.9*
- BA	(n=11)	19.0 ₊	107.2 ₊	33.7 ₊
		7.7	26.1	15.2
- MR/GO	(n=4)	10.9 ₊	104.4 ₊	12.8 ₊
		1.9	18.8	1.8

Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 4 Experimenten

* signifikant verschieden von der Kontrolle ($2P < 0.05$)

koll (NaCl-Adaptation der Tiere und Inkubation der Serosaseite der Blasen in 5 mM Pyruvat) durchgeführt wurden. Zusätzlich werden die Chlorkonzentrationen mitaufgeführt.

Nach Aldosteron war in den Granularzellen ein durchschnittlicher Anstieg der Natriumwerte um 1.7 und in den Basalzellen um 3.4 mmol/kg Feuchtgewicht festzustellen, der jedoch im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Einzelexperiment (vergl. Abb. 19) auch im Falle der Granularzellen aufgrund der Streuung der Meßwerte nicht signifikant war. Eine Ausnahme im epithelialen Zellverband scheinen die MR/GO-Zellen zu bilden. Der im Einzelversuch zu beobachtende Natriumanstieg in diesen Zellen war im Mittel der 4 Versuche nicht feststellbar.

Die Kaliumwerte waren in allen Zellen nach Aldosteron niedriger als unter Kontrollbedingungen, die Unterschiede waren aber nicht signifikant. Bei den Chlorwerten zeigte sich für die Granularzellen ein geringer, aber signifikanter Abfall von 3.9 mmol/kg F.G. Zusammenfassend läßt sich für die in pyruvathaltiger Ringerlösung inkubierten Harnblasen feststellen, daß der Kurzschlußstrom bei Aldosterongabe gegenüber der Kontrolle um etwa das eineinhalb- bis zweifache anstieg. Ferner konnte in fast 40 Prozent der Versuche nach zwei bis drei Stunden vor allem bei den mit Aldosteron behandelten Harnblasenhälften eine deutliche Erhöhung der Leitfähigkeit festgestellt werden. Da diese im Gegensatz zu der Hormon-induzierten Leitfähigkeitserhöhung stets mit einer gleichzeitigen deutlichen Abnahme des Kurzschlußstromes verbunden war, muß von einer zunehmenden Verschlechterung des Funktionszustandes dieser Blasen ausgegangen werden. Sie zeigten im histologischen Bild zum Teil auffallend geschwollene Epithelzellen, die ihren nahezu extrazellulären Elektrolytkonzentrationen nach zu urteilen nicht mehr funktionsfähig waren.

4.4 Wirkung von Aldosteron bei Inkubation im Nährmedium (L-15)

Um einen besseren Funktionszustand der Blasen während der Langzeitversuche zu erreichen und dadurch möglicherweise einen größeren Aldosteroneffekt auf den SCC und auch deutlichere Unterschiede in den intrazellulären Elementkonzentrationen zu erzielen, wurde in weiteren Versuchen der Bikarbonatpuffer durch Phosphatpuffer ersetzt. Ein befriedigenderer Effekt zeigte sich jedoch erst, als anstelle des Pyruvats ein Nährmedium in der serosalen Badlösung verwandt wurde (vergl. 3.2). Die Mukosaseite der Harnblase wurde nur in Phosphatringlösung inkubiert.

4.4.1 Eigenwirkung des L-15 Nährmediums

Bevor die Experimente mit dem Phosphatringer L-15 Medium-Gemisch durchgeführt wurden, wurde in dem folgenden Versuch (Abb. 20) die Eigenwirkung des Nährmediums auf den Kurzschlußstrom und auf die zellulären Elementkonzentrationen untersucht. Das Versuchstier war 4 Tage lang in 1/2 isotoner Kochsalzlösung gehalten worden. Aus der Abbildung 20 A geht hervor, daß ein Austausch der Innenbadlösung gegen eine mit Nährmedium angereicherte Lösung für die Zeit von etwa 15 Minuten einen vorübergehenden Abfall des Kurzschlußstromes bewirkte.

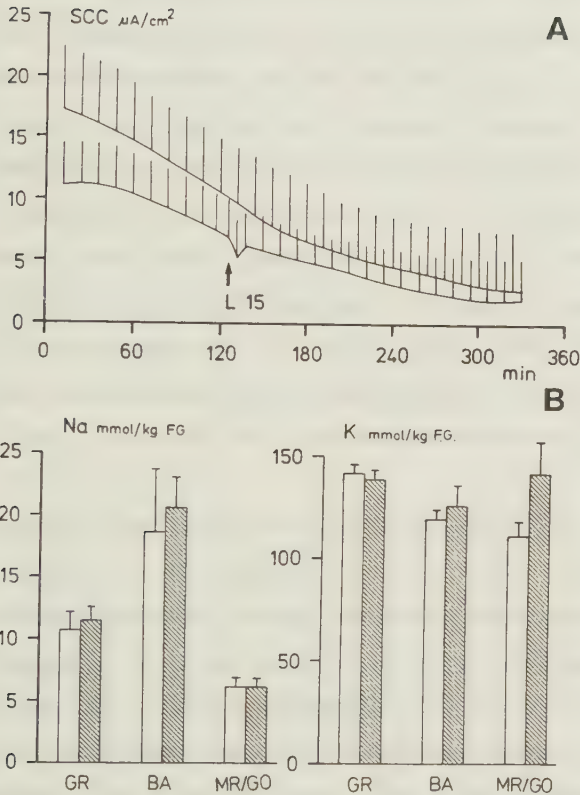


Abb. 20: Die Wirkung von L-15 in der serosalen Badlösung (50 %) auf den Kurzschlußstrom (SCC, in A) und die zellulären Na- und K-Konzentrationen (in B).

- A) Verlauf des SCC unter L-15 im Vergleich zur Kontrolle (obere Kurve). Senkrechte Linien (nicht skaliert) entsprechen der relativen Blasenleitfähigkeit.
- B) Na- und K-Konzentrationen in den verschiedenen Epithelzelltypen (GR = Granularzellen, BA = Basalzellen, MR/GO = mitochondrienreiche/schleimproduzierende (-goblet cells-) Zellen). Offene Säulen = Kontrollwerte, schraffierte Säulen = L-15-Werte. Balken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Dieser Abfall läßt sich nicht durch die beim Lösungsaustausch auftretenden kurzfristigen hydrostatischen Druckunterschiede zwischen den Vorratsgefäßen für die Außen- und Innenbadlösung erklären. In der Kontrollblasenhälfte, bei der die Innenbadlösung in der gleichen Weise gegen eine neue Ringerlösung ausgetauscht wurde, war dieser Effekt nicht zu beobachten. Auch Unterschiede in den Temperaturen oder Osmolaritäten können nicht zur Erklärung der Wirkung des Nährmediums auf den SCC herangezogen werden, da diese bei allen verwendeten Inkubationslösungen gleich waren (vergl. 3.2). Somit muß von einer Eigenwirkung des Nährmediums auf den Kurzschlußstrom ausgegangen werden (siehe Diskussion). Die in diesem Versuch beobachtete kontinuierliche Abnahme des SCC war untypisch. In der Regel war eine stabilisierende Wirkung des Nährmediums auf den SCC (vergl. Abb. 24) festzustellen.

Die zellulären Natrium- und Kaliumkonzentrationen wurden durch das Medium nicht wesentlich beeinflusst (Abb. 20 B). Keine der im Folgenden beschriebenen Veränderungen erwies sich als signifikant. In den Granularzellen lagen die Natriumkonzentrationen bei 10.7 ± 8.5 ($n=31$) ohne und bei 11.5 ± 6.4 ($n=24$) mmol/kg F.G. nach Zugabe des Nährmediums zur serosalen Badlösung. Auch in den Basalzellen stieg die Natriumkonzentration bei Verwendung des Mediums nur geringfügig von 18.8 ± 12.3 ($n=6$) auf 20.7 ± 6.9 ($n=8$) mmol/kg F.G. an. Der Natriumgehalt der MR/GO-Zellen war mit 6.3 ± 1.3 ($n=3$) unter Kontrollbedingungen und mit 6.3 ± 1.0 ($n=2$) mmol/kg F.G. bei Verwendung der nährstoffangereicherten Innenbadlösung unverändert. Auf die Kaliumwerte der Granular- und Basalzellen hatte das Nährmedium ebenfalls keine entscheidenden Einflüsse. In den Granularzellen wurden Kaliumwerte von 141.8 ± 27.2 ohne und von 139.1 ± 19.6 mmol/kg F.G. mit L-15 Nähr-

medium ermittelt. Die entsprechenden Werte für die Basalzellen betrugen 119.5 ± 12.2 und 125.8 ± 9.9 mmol/kg F.G. Obwohl sich die Kaliumwerte der MR/GO-Zellen mit 110.7 ± 12.5 in der Kontrolle und mit 141.8 ± 24.2 mmol/kg F.G. in der L-15 behandelten Blasenhälfte zwar deutlicher voneinander unterschieden, sollte dieser Befund aufgrund der geringen Anzahl an Messungen nicht überbewertet werden.

Nach den Ergebnissen dieses Einzelexperiments scheint sich die Wirkung des Nährmediums auf den vorübergehenden Abfall des SCC zu beschränken. Eine wesentliche Beeinflussung der Natrium- und Kaliumkonzentrationen konnte nicht festgestellt werden. Auch die Konzentrationen der anderen Elemente, wie Chlor, Schwefel oder Phosphor, zeigten nur minimale Unterschiede. Dasselbe galt auch für das Trockengewicht.

2 Versuche an Harnblasen von nicht NaCl-adaptierten Tieren

In drei Versuchen wurde die Wirkung von Aldosteron an Harnblasen von Kröten untersucht, die nicht in Kochsalzlösungen gehalten worden waren. In der Abbildung 21 ist ein typisches nach diesem Protokoll durchgeführtes Experiment wiedergegeben. Während bei der Kontrollhälfte nach etwa 90 Minuten ein kontinuierlicher Abfall des SCC von 55.6 auf $24.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ zu beobachten war, veränderte sich der SCC bei der mit Aldosteron behandelten Blasenhälfte zunächst nur unwesentlich. Erst nach 4 Stunden war bei dieser Blasenhälfte ein Anstieg des SCC von 28.5 auf $36.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ zu verzeichnen. Außer dem Abfall des SCC war unter Kontrollbedingungen eine minimale Abnahme der Leitfähigkeit von 0.7 auf $0.6 \text{ mS}/\text{cm}^2$ festzustellen, wohingegen die Leitfähigkeit unter Aldosteron von 0.41 auf $0.5 \text{ mS}/\text{cm}^2$ zunahm.

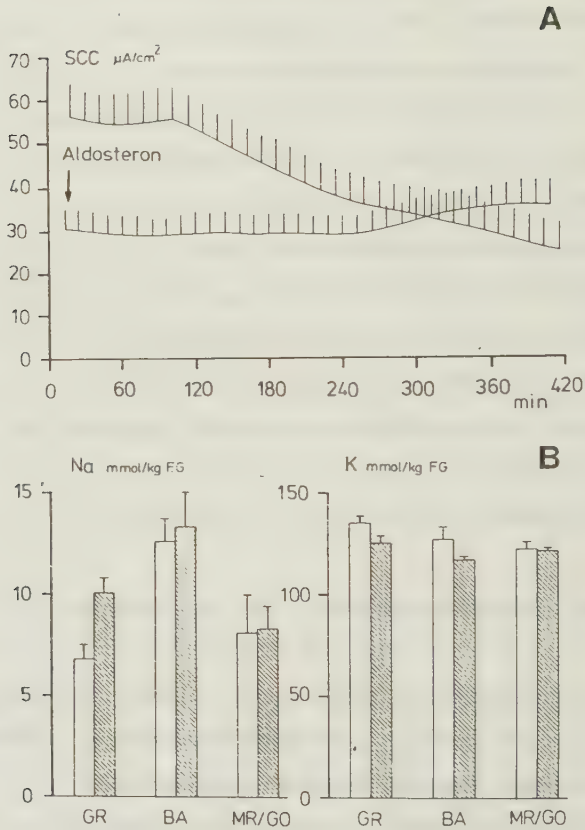


Abb. 21: Die Wirkung von Aldosteron (5.4×10^{-7} M) auf den Kurzschlußstrom (SCC, in A) und die zellulären Na- und K-Konzentrationen (in B) bei einer nicht NaCl-adaptierten Kröte.

- A) Verlauf des SCC unter Aldosteron im Vergleich zur Kontrolle (obere Kurve). Die serosale Badlösung bestand zu 50 % aus L-15 Nährmedium. Senkrechte Linien (nicht skaliert) entsprechen der relativen Blasenleitfähigkeit.
- B) Na- und K-Konzentrationen in den verschiedenen Epithelzelltypen (GR = Granularzellen, BA = Basalzellen, MR/GO = mitochondrienreiche/schleimproduzierende (-goblet cells-) Zellen). Offene Säulen = Kontrollwerte, schraffierte Säulen = Aldosteronwerte. Balken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Im Vergleich zu den Harnblasen von NaCl-adaptierten Tieren fällt der nahezu spiegelbildliche Verlauf der Kurzschlußstromkurven auf. In etwa dem gleichen Maße wie der SCC und die Leitfähigkeit bei den Blasen der unbehandelten Kröten unter Kontrollbedingungen über den Versuchszeitraum abfielen, stiegen diese in den Blasen der NaCl-vorbehandelten Kröten unter Aldosteron an. Dasselbe spiegelbildliche Verhalten von SCC und Leitfähigkeit unter Kontroll- bzw. Aldosteronbedingungen bei unterschiedlicher Vorbehandlung der Tiere wurde bereits für die in pyruvathaltiger Ringerlösung inkubierten Blasen beschrieben, wenn gleich dort die Effekte weniger deutlich ausgeprägt waren (vergl. 4.3).

Dieser Befund deutet an, daß der Aldosteronspiegel bei den unbehandelten Tieren anfangs noch relativ hoch ist und während der Langzeitinkubation mit dem zunehmenden Verfall des Hormons absinkt. Durch die Applikation von Aldosteron während des Versuches kann der Hormonspiegel aber annähernd auf dem Ausgangsniveau gehalten werden, und der Kurzschlußstrom bleibt gleich oder steigt wie in dem hier dargestellten Experiment sogar etwas an.

Im Mittel der drei Versuche, die an Harnblasen von nicht NaCl-adaptierten Tieren durchgeführt wurden, war in den Kontrollhälften während des Versuchsverlauf ein Abfall des SCC von 55.2 auf 20.7 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ festzustellen. Die Aldosteron-behandelten Hälften zeigten dagegen mit 38.2 und 39.1 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ nahezu unveränderte Transportleistungen.

Die Natrium- und Kaliumwerte des oben dargestellten Einzelexperimentes (vergl. Abb 21 B) zeigten ähnliche hormonell induzierte Veränderungen, wie sie vorher für die Epithelzellen der Blasen von NaCl-adaptierten Tieren beschrieben wurden.

Die Granularzellen wiesen nach Aldosteron einen Natriumgehalt von

10.1 ± 3.1 ($n=16$) auf, der sich signifikant von dem Natriumgehalt von 6.8 ± 3.9 ($n=30$) mmol/kg F.G. in der Kontrollhälfte unterschied ($2P < 0.005$). Auch in den Basalzellen wurden nach Aldosteron etwas höhere Natriumwerte gegenüber der Kontrolle ermittelt. Hier lagen die Werte bei 12.6 ± 3.6 ($n=9$) und 13.3 ± 5.3 ($n=9$) mmol/kg F.G. In den MR/GO-Zellen unterschieden sich die Natriumkonzentrationen von 8.1 ± 4.1 ($n=2$) unter Kontrollbedingungen und von 8.3 ± 3.8 ($n=2$) mmol/kg F.G. nach Aldosteron kaum voneinander.

Reziprok zu den höheren Natriumwerten wurden in den Granular- und Basalzellen nach Aldosteron niedrigere Kaliumwerte von 125.4 ± 16.0 und 116.8 ± 5.4 gegenüber 135.1 ± 21.1 bzw. 127.3 ± 18.2 mmol/kg F.G. in den Kontrollhälften ermittelt. In den MR/GO-Zellen waren die Kaliumkonzentrationen mit 122.5 ± 5.1 unter Kontrollbedingungen und mit 121.9 ± 3.8 mmol/kg F.G. bei Aldosteron nahezu unverändert.

In Tabelle 4 sind die Mittelwerte der Natrium-, Kalium- und Chlorkonzentrationen für die drei Versuche zusammengestellt, die an den Blasen von nicht NaCl-adaptierten Tieren bei Verwendung des Nährmediums im Innenbad durchgeführt wurden.

Tab. 4: Elementkonzentrationen (mmol/kg F.G.) in den verschiedenen Epithelzellen unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von Aldosteron ohne NaCl-Adaptation der Versuchstiere. Die serosale Badlösung bestand zu 50 % aus dem L-15 Nährmedium.

		Na	K	Cl
Kontrolle				
- GR	(n=74)	8.0 ₊	134.5 ₊	36.9 ₊
		6.1	21.8	10.7
- BA	(n=24)	15.7 ₊	123.4 ₊	39.1 ₊
		7.2	19.9	10.8
- MR/GO	(n=8)	9.4 ₊	123.2 ₊	7.3 ₊
		2.8	10.2	5.0
Aldosteron				
- GR	(n=81)	13.0 ₊	125.4 ₊	37.3 ₊
		9.4*	20.3*	12.1
- BA	(n=32)	19.9 ₊	113.0 ₊	34.7 ₊
		7.4*	15.6*	8.4
- MR/GO	(n=11)	8.7 ₊	121.6 ₊	11.1 ₊
		4.6	8.7	4.9

Mittelwerte ₊ Standardabweichung von 3 Experimenten

* signifikant verschieden von der Kontrolle ($2P < 0.05$)

Wie im Einzelexperiment (vergl. Abb. 21) zeigten sich auch im Mittel dieser drei Experimente in den Granularzellen höhere Natrium- und niedrigere Kaliumwerte nach Aldosteron. Sowohl der Anstieg der Natriumkonzentrationen um 5.0 als auch der Abfall der Kaliumkonzentrationen um 9.1 mmol/kg Feuchtgewicht waren signifikant ($2P < 0.001$)

und $2P < 0.01$). In den Basalzellen waren die um 4.2 höheren Natrium- und die um 10.4 mmol/kg Feuchtgewicht niedrigeren Kaliumwerte gleichfalls signifikant von den Kontrollwerten verschieden ($2P < 0.037$ und $2P < 0.033$). Im Gegensatz zu den Granular- und Basalzellen veränderten sich die Natrium- und Kaliumkonzentrationen in den MR/GO-Zellen nicht. Die Chlorkonzentrationen in den verschiedenen Epithelzellen blieben im wesentlichen durch die Hormonwirkung unbeeinflusst. Dasselbe galt für die Schwefel- und Phosphorkonzentrationen und auch für das Trockengewicht.

4.4.3 Versuche an Harnblasen von NaCl-adaptierten Tieren

Die Abbildung 22 zeigt den Verlauf einer Kurzschlußstromkurve nach Gabe von Aldosteron über einen Versuchszeitraum von mehr als 17 Stunden. Die Innenbadlösung war mit dem Nährmedium angereichert worden. Bei der Wirkung des Hormons auf den Kurzschlußstrom können zwei Phasen unterschieden werden. Nach einem anfänglichen leichten Anstieg nach etwa 70 Minuten nach Applikation des Hormons blieb der Kurzschlußstrom in der Zeit von etwa 160 bis 240 Minuten relativ unverändert, um dann in einer zweiten Phase stärker anzusteigen, bis er schließlich ungefähr 710 Minuten nach der Hormongabe ein Maximum erreicht hat. Dieser maximal erreichte Kurzschlußstromwert von $29.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ lag um 219 % höher als der Ausgangswert von $9.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und blieb für die Dauer von fast 3 Stunden im wesentlichen unverändert. Außerdem führte Aldosteron zu einer deutlichen Erhöhung der Leitfähigkeit von 0.28 auf $1.19 \text{ mS}/\text{cm}^2$. Der nach einer Versuchsdauer von mehr als 15 Stunden beobachtete Abfall des Kurzschlußstromes, der mit einer weiteren Leitfähigkeitserhöhung verbunden war, läßt auf eine

allmähliche Verschlechterung der transepithelialen Transportleistung schließen. Von daher konnten in den Epithelzellen dieses Harnblasenstückes keine Elementbestimmungen mittels der Elektronenstrahlmikroanalyse durchgeführt werden.

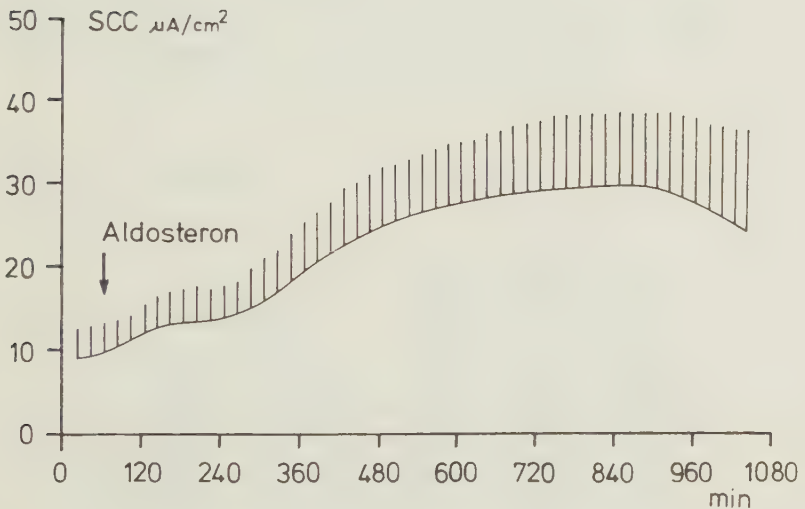


Abb. 22: Verlauf des Kurzschlußstromes (SCC) unter Aldosteron (5.4×10^{-7} M) bei einer NaCl-adaptierten Kröte. Die serosale Badlösung bestand zu 50 % aus L-15 Nährmedium. Senkrechte Linien (nicht skaliert) entsprechen der relativen Blasenleitfähigkeit.

Für Harnblasen, die mittels der Elektronenstrahlmikroanalyse ausgewertet werden sollten, wurden Inkubationszeiten von etwa 3 bis 6 Stunden gewählt, um so die Ergebnisse mit den vorherigen Ergebnissen

besser vergleichen zu können. In Abb. 23 ist ein derartiges Experiment dargestellt. Hier konnte der Kurzschlußstrom unter Verwendung der Nährlösung durch Aldosteron um mehr als das 5-fache gesteigert werden (Abb. 23 A). Etwa 45 Minuten nach Applikation des Hormons stieg der Kurzschlußstrom von $14.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ an und erreichte etwa 5 Stunden später seinen Maximalwert von 76.3 (obere SCC-Kurve). Ferner zeigte sich die Hormonwirkung wiederum in einer Zunahme der Leitfähigkeit von 0.25 auf $0.32 \text{ mS}/\text{cm}^2$ bei maximalem Kurzschlußstrom.

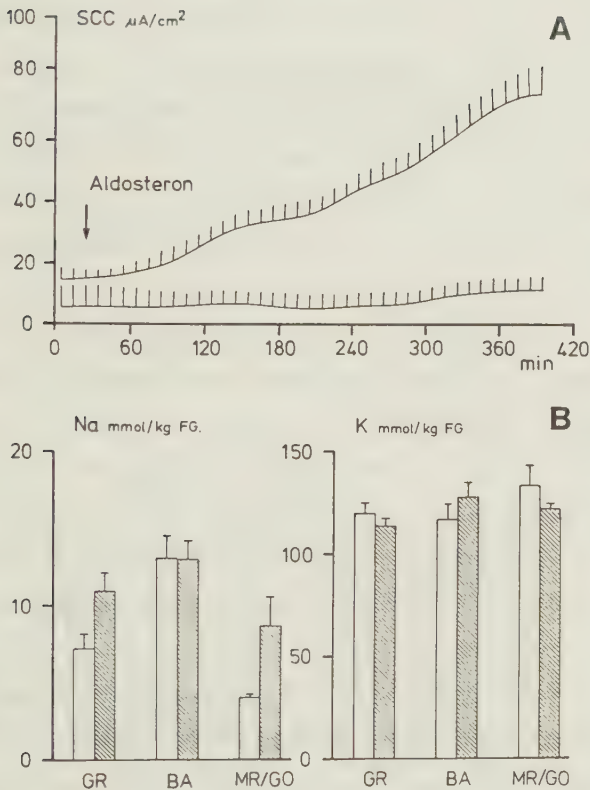


Abb. 23: Die Wirkung von Aldosteron (5.4×10^{-7} M) auf den Kurzschlußstrom (SCC, in A) und die zellulären Na- und K-Konzentrationen (in B) bei einer NaCl-adaptierten Kröte.

- A) Verlauf des SCC unter Aldosteron im Vergleich zur Kontrolle (untere Kurve). Die serosale Badlösung bestand zu 50 % aus L-15 Nährmedium. Senkrechte Linien (nicht skaliert) entsprechen der relativen Blasenleitfähigkeit.
- B) Na- und K-Konzentrationen in den verschiedenen Epithelzelltypen (GR = Granularzellen, BA = Basalzellen, MR/GO = mitochondrienreiche/schleimproduzierende (-goblet cells-) Zellen). Offene Säulen = Kontrollwerte, schraffierte Säulen = Aldosteronwerte. Balken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Die Wirkung von Aldosteron auf die intrazellulären Natrium- und Kaliumkonzentrationen in diesem Experiment geht aus der Abbildung 23 B hervor. In den Granular- und MR/GO-Zellen konnten nach Aldosteron deutlich höhere Natriumwerte gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. In den Granularzellen stieg die Natriumkonzentration von 7.2 ± 4.1 (n=16) auf 10.9 ± 5.5 mmol/kg F.G. (n=22; $2P < 0.05$) und in den MR/GO-Zellen von 4.1 ± 0.4 (n=5) auf 8.7 ± 3.8 mmol/kg F.G. (n=4; $2P < 0.05$). Demgegenüber waren die Werte in den Basalzellen nahezu unverändert. Hier wurden Natriumkonzentrationen von 13.2 ± 2.2 (n=2) unter Kontrollbedingungen bzw. von 12.9 ± 2.8 mmol/kg F.G. (n=5) nach Aldosteron gemessen. Reziprok zu dem Natriumanstieg konnte in den Granular- und MR/GO-Zellen ein Abfall der Kaliumwerte von 120.0 ± 21.9 auf 113.6 ± 16.3 bzw. von 133.3 ± 23.8 auf 122.1 ± 5.3 mmol/kg F.G. nachgewiesen werden. In den Basalzellen war hingegen nach Aldosteron ein Anstieg von 116.7 ± 10.4 auf 127.7 ± 18.7 mmol/kg F.G. festzustellen. Die Änderungen der Kaliumwerte waren nicht signifikant.

Eine ähnlich deutliche Stimulation des Kurzschlußstromes konnte auch beobachtet werden, wenn das Hormon auf die Harnblase gegeben wurde, die die niedrigeren Kurzschlußstromwerte aufwies (Abb. 24 A). Der in den vorderen Kurvenabschnitten beobachtbare kurzfristige Abfall des SCC ist auf die Eigenwirkung des L-15 Nährmediums zurückzuführen (vergl. 4.4.1). Nach einer zeitlichen Verzögerung von etwa 1 Stunde war nach Aldosteron eine deutliche Zunahme des SCC und eine allmähliche Erhöhung der Leitfähigkeit zu vermerken. Von $11.9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ stieg der SCC in etwa 4 Stunden auf einen maximalen Wert von $29.9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ an, der um 151 % höher lag als der Kontrollwert, wobei die Werte für die Leitfähigkeit 0.37 und $0.53 \text{ mS}/\text{cm}^2$ betrugen.

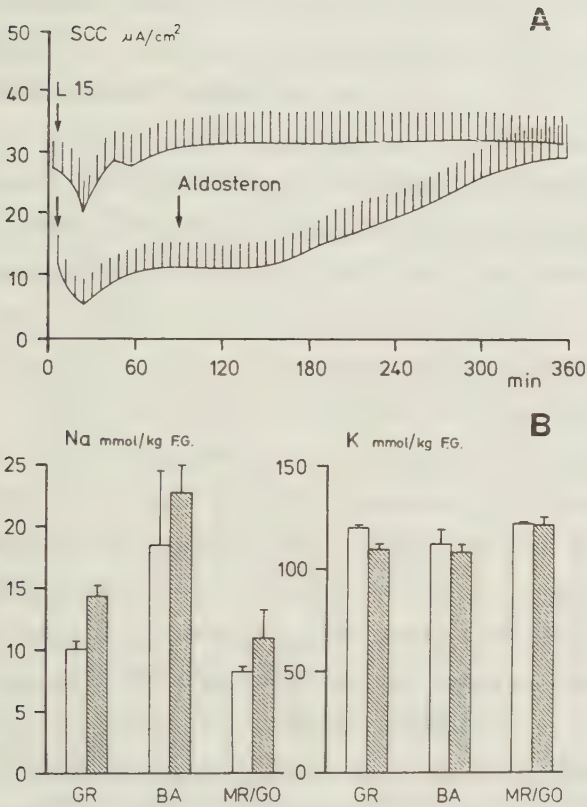


Abb. 24: Die Wirkung von Aldosteron (5.4×10^{-7} M) auf den Kurzschlußstrom (SCC, in A) und die zellulären Na- und K-Konzentrationen (in B) bei einer NaCl-adaptierten Kröte.

- A) Verlauf des SCC unter Aldosteron im Vergleich zur Kontrolle (obere Kurve). Die serosale Badlösung wurde jeweils zu Versuchsbeginn mit L-15 Nährmedium (50 %) angereichert. Senkrechte Linien (nicht skaliert) entsprechen der relativen Blasenleitfähigkeit.
- B) Na- und K-Konzentrationen in den verschiedenen Epithelzelltypen (GR = Granularzellen, BA = Basalzellen, MR/GO = mitochondrienreiche/schleimproduzierende (-goblet cells-) Zellen). Offene Säulen = Kontrollwerte, schraffierte Säulen = Aldosteronwerte. Balken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Obwohl sich die Kurzschlußstromwerte der beiden Harnblasenhälften zum Zeitpunkt des Einfrierens kaum mehr voneinander unterschieden, zeigten ihre Epithelzellen ähnliche Veränderungen der Elementkonzentrationen, wie sie für den vorherigen Versuch beschrieben worden waren, bei welchem die Kurzschlußstromwerte gegen Versuchsende extrem weit auseinanderlagen (vergl. Abb. 23). Unter Aldosteron wurde in den Granularzellen eine Natriumkonzentration von 14.4 ± 5.6 ($n=41$) gegenüber 10.1 ± 4.2 mmol/kg F.G. ($n=26$) unter Kontrollbedingungen ($2P < 0.002$) festgestellt. In den Basalzellen bewirkte das Hormon einen Anstieg der Natriumkonzentration von 18.5 ± 12.2 ($n=3$) auf 22.8 ± 5.4 ($n=6$) und in den MR/GO-Zellen von 8.2 ± 0.5 ($n=2$) auf 11.0 ± 3.9 ($n=3$) mmol/kg F.G. Reziprok zu dem Natriumanstieg fiel in den Granularzellen die Kaliumkonzentration von 119.9 ± 7.4 auf 109.6 ± 13.0 mmol/kg F.G. ab, wohingegen in den Basalzellen die Kaliumwerte nach Aldosteron ein wenig höher lagen. Hier wurde eine Kaliumkonzentration von 119.9 ± 7.4 gegenüber 108.3 ± 9.2 mmol/kg F.G. unter Kontrollbedingungen gemessen. Die Kaliumwerte der MR/GO-Zellen waren mit 121.8 ± 0.1 für die Kontroll- und 121.5 ± 7.5 mmol/kg F.G. für die in Aldosteron inkubierte Harnblasenhälfte nahezu unverändert.

Die Tabelle 5 faßt die Meßdaten von insgesamt vier Versuchen zusammen, die an Harnblasen von NaCl-adaptierten Kröten (3 bis 4 Tage 1/2 isotone NaCl-Lösung) unter Verwendung von Nährmedium im Innenbad durchgeführt wurden. Im Mittel war der SCC von 12.1 auf $51.0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ angestiegen. Obwohl die Natriumkonzentration in den Granularzellen nach Aldosteron nur um durchschnittlich 3.2 mmol/kg F.G. höher lag, war diese Differenz hoch signifikant ($2P < 0.001$). Auch die gegenüber der Kontrolle um 6.2 mmol/kg F.G. niedrigere Chlorkonzentration erwies sich als signifikant unterschiedlich ($2P < 0.001$). Der in den

Einzelexperimenten (Abb. 23 und 24) zu beobachtete Abfall der Kaliumkonzentration in den Granularzellen unter Aldosteron zeigte sich im Mittel dieser vier Versuche nicht.

Tab. 5: Elementkonzentrationen (mmol/kg F.G.) in den verschiedenen Epithelzellen unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von Aldosteron bei NaCl-Adaptation der Versuchstiere.

		Na	K	Cl
Kontrolle				
- GR	(n=93)	9.8 ₊	115.6 ₊	46.9 ₊
		4.6	17.2	12.5
- BA	(n=16)	22.9 ₊	110.4 ₊	51.0 ₊
		7.7	14.3	10.3
- MR/GO	(n=7)	6.8 ₊	130.0 ₊	14.1 ₊
		2.1	20.3	9.6
Aldosteron				
- GR	(n=121)	13.0 ₊	115.6 ₊	40.7 ₊
		6.5*	14.9	10.3*
- BA	(n=25)	18.2 ₊	112.6 ₊	48.9 ₊
		6.3*	14.7	8.6
- MR/GO	(n=15)	8.2 ₊	128.8 ₊	17.0 ₊
		3.1	17.6	9.0

Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 4 Experimenten

* signifikant verschieden von der Kontrolle ($2P < 0.05$)

In den Basalzellen wurde im Gegensatz zu den Granularzellen ein Absinken der Natriumkonzentration um 4.7 mmol/kg F.G. unter Aldosteron ($2P < 0.05$) gemessen. Die Kaliumwerte unterschieden sich hier nur unwesentlich. Auch der nach Aldosteron um durchschnittlich 2.1 mmol/kg F.G. niedrigere Chlorgehalt war in diesen Zellen nicht signifikant von den Kontrollwerten verschieden. In den MR/GO-Zellen führte Aldosteron zu einem Natriumanstieg von 1.4 mmol/kg F.G. , der jedoch nicht signifikant war. Die übrigen Elementkonzentrationen und das Trockengewicht blieben im wesentlichen unverändert.

Wirkung des antidiuretischen Hormons (Argininvasopressin, AVP) auf den transepithelialen Natriumtransport und die zellulären Elementkonzentrationen

Die Abbildung 25 A zeigt den Verlauf einer Kurzschlußstromkurve bei Applikation von AVP (150 mU/ml) zur serosalen Badlösung, die wegen der kurzen Versuchsdauer weder mit Pyruvat noch mit Nährmedium angereichert war. Beide Seiten der Harnblase wurden in normaler Ringerlösung inkubiert.

Innerhalb von 8 bis 10 Minuten nach Hormongabe stieg der SCC von 19.1 auf einen Maximalwert von $49.8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ an, der um 161% über dem Ausgangs- oder Kontrollwert lag. In den folgenden 20 Minuten fiel der SCC wieder ab, bis er einen neuen Gleichgewichtswert von $35.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ erreicht hatte, der nur um 87% höher als der Kontrollwert lag. Gleichzeitig führte das antidiuretische Hormon zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit von 0.3 auf $0.6 \text{ mS}/\text{cm}^2$ bei maximal erreichtem SCC bzw. auf $0.4 \text{ mS}/\text{cm}^2$ bei Erreichen des neuen Gleichgewichtswertes. Während des Versuchszeitraumes veränderten sich der SCC ($30.9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) und die Leitfähigkeit ($0.7 \text{ mS}/\text{cm}^2$) unter Kontrollbedingungen nicht (Abb. 25 B).

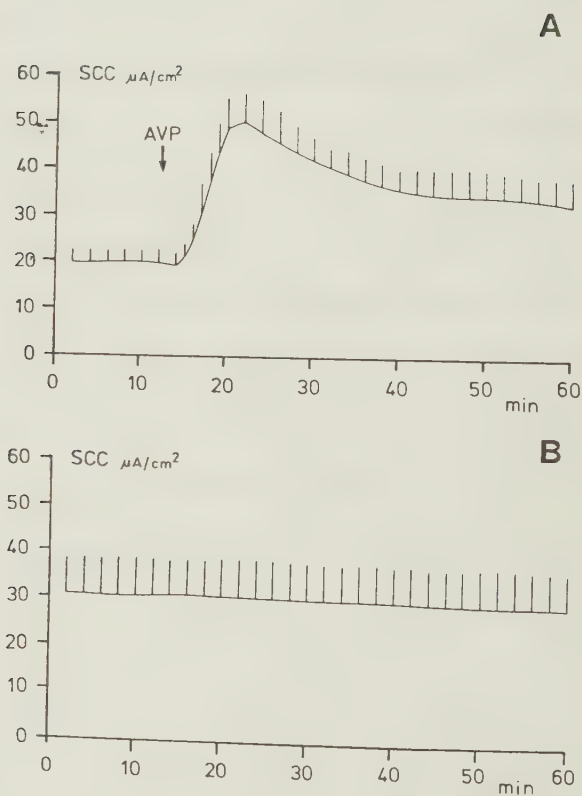


Abb. 25: Die Wirkung von AVP (150 mU/ml) auf den Kurzschlußstrom (SCC). Verlauf des SCC unter AVP (A) im Vergleich zur Kontrolle (B). Senkrechte Linien (nicht skaliert) entsprechen der relativen Blasenleitfähigkeit.

In der Abbildung 26 A sind die Änderungen der Natrium- und Kaliumwerte in den Epithelzellen nach einer AVP-Inkubation von 45 min dargestellt. Nach AVP ist die Natriumkonzentration in den Granularzellen von 14.0 ± 5.3 (n=9) auf 22.5 ± 9.2 (n=19; $2P < 0.017$) und in den Basalzellen von 26.7 ± 2.9 (n=4) auf 36.3 ± 8.9 mmol/kg F.G. (n=5) angestiegen. Die Kaliumkonzentrationen blieben in den Granularzellen im wesentlichen unverändert. Sie betrugen 110.9 ± 13.9 unter Kontroll- und 112.2 ± 18.9 mmol/kg F.G. unter AVP-Bedingungen. In den Basalzellen war nach AVP eine Abnahme der Kaliumkonzentrationen von 103.5 ± 2.6 auf 88.1 ± 10.5 mmol/kg F.G. ($2P < 0.009$) festzustellen. Da in der Kontrollblasenhälfte keine MR/GO-Zellen sicher identifiziert werden konnten, waren hier AVP-induzierte Veränderungen der Elementkonzentrationen nicht überprüfbar. Das normale Elementverteilungsmuster (Na=9.4 und K=120.7 mmol/kg F.G.), welches in einer MR/GO-Zelle der mit AVP behandelten Blasenhälfte nachgewiesen wurde, läßt aber vermuten, daß sich die Wirkung des Hormons im wesentlichen auf die Granular- und Basalzellen beschränkt.

Wurden die Blasen direkt zu dem Zeitpunkt der maximalen Kurzschlußstromstimulation eingefroren, so zeigten sich die im Folgenden beschriebenen Konzentrationsänderungen (Abb. 26 B). In den Granularzellen konnte zu diesem Zeitpunkt nach AVP ein deutlich stärkerer Anstieg der Natriumkonzentrationen von 9.0 ± 5.0 (n=47) auf 41.5 ± 14.6 mmol/kg F.G. (n=26; $2P < 0.001$) nachgewiesen werden. Die Kaliumwerte waren umgekehrt in der mit AVP behandelten Blasenhälfte niedriger. Sie betrugen 105.5 ± 20.9 gegenüber 129.9 ± 23.1 mmol/kg F.G. unter Kontrollbedingungen ($2P < 0.001$). In den Basalzellen führte das Hormon zu einem weniger ausgeprägten Anstieg der Natriumwerte von 21.5 ± 6.5 (n=2) auf 25.2 ± 13.1 mmol/kg F.G. (n=4). Auch hier wurde

nach AVP ein niedrigerer Kaliumwert von 110.2 ± 4.6 im Vergleich zu 129.0 ± 35.1 mmol/kg F.G. in der Kontrollhälfte festgestellt. Die MR/GO-Zellen wiesen bei beiden Bedingungen in etwa die gleichen Natriumkonzentrationen auf. Diese betrugen in mmol/kg F.G. 14.3 ± 3.2 (n=2) unter Kontrollbedingungen und 13.5 ± 1.4 (n=4) bei Applikation des Hormons. Die entsprechenden Werte für die Kaliumkonzentrationen waren 127.7 ± 3.4 und 117.9 ± 12.7 mmol/kg F.G.

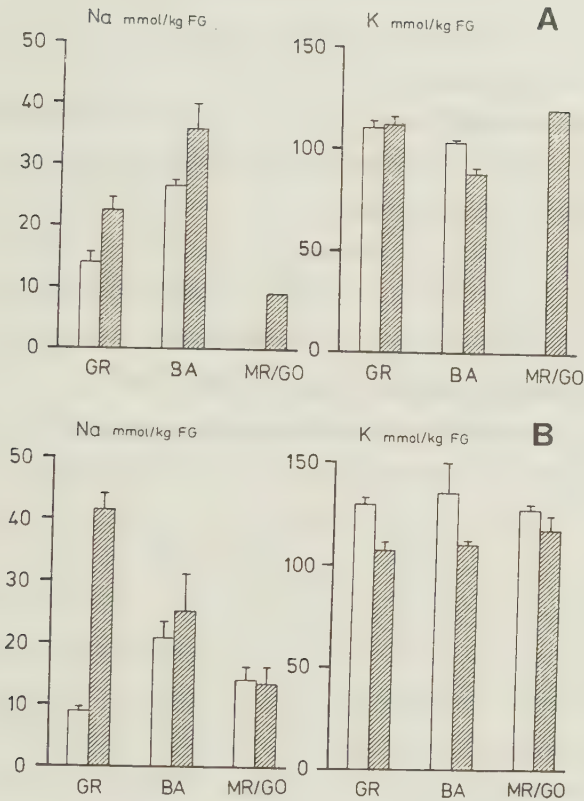


Abb. 26: Die Wirkung von AVP (150 mU/ml) auf die Na- und K-Konzentrationen in den verschiedenen Epithelzelltypen (GR = Granularzellen, BA = Basalzellen, MR/GO = mitochondrienreiche/schleimproduzierende (-goblet cells-) Zellen).

A) Na- und K-Konzentrationen bei Erreichen eines neuen "steady-state" SCC-Wertes (45 min nach AVP-Gabe).

B) Na- und K-Konzentrationen bei maximaler SCC-Stimulation (10 min nach AVP-Gabe).

Offene Säulen = Kontrollwerte, schraffierte Säulen = AVP-Werte.

Balken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Durch einen zweiten Versuch, bei welchem ebenfalls zum Zeitpunkt des maximalen Kurzschlußstromwertes nach AVP eingefroren wurde, konnte der Befund eines deutlichen Natriumanstieges in den Granularzellen, eines weniger ausgeprägten Natriumanstieges in den Basalzellen und nahezu unveränderter Natriumkonzentrationen in den MR/GO-Zellen bestätigt werden. Nach AVP wurden Natriumkonzentrationen von 37.6 ± 13.5 (n=17) gegenüber 14.1 ± 7.2 (n=9) in den Granularzellen ($2P < 0.001$), von 24.3 ± 8.4 (n=6) gegenüber 22.2 ± 7.5 (n=5) in den Basalzellen und von 8.5 ± 4.5 (n=4) gegenüber 7.5 ± 2.0 (n=3) mmol/kg Feuchtgewicht in den MR/GO-Zellen festgestellt. In allen drei mit AVP durchgeführten Versuchen ergaben sich für die anderen Elektrolyte, wie Phosphor oder Chlor, keine wesentlichen Konzentrationsänderungen.

Diskussion

Elementkonzentrationen im Kern und Zytoplasma

Die Analysen ergaben für keine experimentelle Bedingung statistisch signifikante Unterschiede in den Natrium- bzw. Kaliumkonzentrationen zwischen Kern und Zytoplasma. Dies deutet darauf hin, daß die Kernmembran keine Barriere für die Bewegung kleiner Ionen darstellt. Eine gleiche Verteilung der Elektrolytkonzentrationen wurde bereits früher in den Epithelzellen der Krötenharnblase beobachtet (Rick et al., 1978a). Aber auch Untersuchungen an anderen Epithelien, wie der Froshhaut (Rick et al., 1978b), der Krötenhaut (Rick et al., 1980) oder der Rattenniere (Beck et al., 1980 und 1982), ergaben keinen Hinweis auf eine mögliche Trennfunktion der Kernmembran für die leicht diffusiblen Elemente, wie Natrium und Kalium.

Im Gegensatz dazu zeigten chemische Analysen an fraktionierten Leberzellen (Siebert und Langendorf, 1970; Hooper und Dick, 1976) im Kern deutlich höhere Natrium- und Kaliumkonzentrationen. Dieser Befund konnte jedoch durch die Elektronenstrahlmikroanalyse nicht bestätigt werden (Beck et al., 1982). Die mit der Sonde untersuchten Ratten- und Mäuseleberhepatozyten wiesen wie andere Epithelzellen keine signifikant unterschiedlichen Natrium- und Kaliumkonzentrationen zwischen Kern und Zytoplasma auf.

Der Annahme, daß Kern und Zytoplasma einen gemeinsamen Verteilungsraum für Elektrolyte darstellen, widerspricht jedoch der Befund höherer Chlorkonzentrationen im Zytoplasma. Ein gegenüber dem Zytoplasma negatives elektrisches Potential über der Kernmembran (Löwenstein und Kanno, 1963) kann nicht die Ursache für diese Vertei-

lung sein, da für andere Ionen, wie z.B. Kalium, keine entsprechende Verteilung nach dem Potential festgestellt wurde. Die erhöhten Chlorwerte im Zytoplasma lassen demnach eher auf das Vorhandensein eines intrazytoplasmatischen Kompartimentes mit hohen Chlorkonzentrationen schließen, möglicherweise das endoplasmatische Retikulum (Birks und Davey, 1969). Auch im Skelettmuskel wurden im sarkoplasmatischen Retikulum geringfügig höhere Chlorkonzentrationen als im Zytoplasma festgestellt (Gonzalez-Serratos et al., 1978). Für das Vorhandensein eines intrazytoplasmatischen Kompartimentes mit extrazellulärer Elektrolytzusammensetzung sprechen ebenfalls die etwas höheren Natriumkonzentrationen im Zytoplasma (vergl. Tab. 1).

Die signifikant höheren Kalziumkonzentrationen im Zytoplasma beruhen wahrscheinlich auf der Speicherung von Kalzium in bestimmten zytoplasmatischen Zellorganellen, wie den Mitochondrien oder Mikrosomen (Chance, 1965; Moore et al., 1974; Brinley et al., 1977). Mit Ausnahme der mit AVP behandelten Harnblasen wiesen die Epithelzellen im Kern und Zytoplasma etwa gleich hohe Phosphorkonzentrationen auf. Der Befund einer höheren Phosphorkonzentration im Kern nach AVP sollte jedoch nicht überbewertet werden, da es sich um ein Einzelexperiment mit nur jeweils 9 Messungen in den beiden Zellkompartimenten handelt und gerade die Werte der Phosphorkonzentrationen im allgemeinen sehr stark variieren können.

2 Wirkung von Aldosteron

2.1 Wirkung von Aldosteron auf die transepitheliale Natriumtransportrate

Die Kurzschlußstrommessungen zeigten unter allen Versuchsbedingungen die stimulierende Wirkung von Aldosteron auf den Natriumtransport der Krötenharnblase.

Bei Harnblasen, deren serosale Seite in pyruvathaltiger Ringerlösung inkubiert wurde, bewirkte die Zugabe von Aldosteron zum Innenbad eine Steigerung des Kurzschlußstromes um das 1.4-fache. Durch eine mehrtägige Vorinkubation der Versuchstiere in Kochsalzlösungen konnte die Aldosteronempfindlichkeit der Harnblasen gesteigert werden. Hier war im Mittel ein 1.6-facher Anstieg des Kurzschlußstromes zu verzeichnen. Eine stärkere Kurzschlußstromstimulation nach Aldosteron bei vorheriger Kochsalzadaptation der Kröten wurde bereits in früheren Untersuchungen (Crabbé, 1961 a und b; Scharp und Leaf, 1964 a und b) beobachtet. Die erhöhte Aldosteronempfindlichkeit wird darauf zurückgeführt, daß durch die Kochsalzadaptation der körpereigene Aldosteronspiegel auf ein Minimum reduziert wird. Dieser Annahme entsprechend waren die Kontrollkurzschlußstromwerte von kochsalzadaptierten Kröten zu Versuchsbeginn deutlich niedriger als die von in Leitungswasser gehaltenen Tieren. Werden die isolierten Harnblasen der kochsalzbeladenen Tiere anschließend in Aldosteron inkubiert, so kann sich die Wirkung des Hormons auf den Natriumtransport in vollem Umfange entfalten. Umgekehrt ist bei den nicht kochsalzadaptierten Tieren der Aldosteronspiegel zu Versuchsbeginn noch relativ hoch (hohe Kurzschlußstromwerte), um dann abzusinken, was die kontinuierliche Abnahme des Kurzschlußstromes unter Kontrollbedingungen er-

klärt. Durch die nachträgliche Applikation des Hormons aber kann der endogene Spiegel annähernd auf seinem Ausgangsniveau gehalten werden, woraus ein Gleichbleiben bzw. in manchen Fällen auch ein geringfügiger Anstieg des Kurzschlußstromes unter Aldosteron resultiert.

Eine noch stärkere hormonelle Wirkung auf den Kurzschlußstrom zeigte sich bei Harnblasen, deren serosale Seite in einer mit Leibovitz-Nährmedium (L-15) angereicherten Badlösung inkubiert wurde. Hier bewirkte Aldosteron einen mittleren Anstieg der transepithelialen Natriumtransportrate um das 2.6-fache ohne Kochsalzadaptation und um das 4.2-fache mit Kochsalzadaptation. Neben der ausgeprägteren Aldosteronwirkung war gegenüber den nur mit pyruvathaltiger Ringerlösung durchgeführten Versuchen ein stabilerer Verlauf der Kurzschlußstromkurven festzustellen, was auf einen besseren Funktionszustand dieser Harnblasen schließen läßt. Die Aldosteronversuche wurden durch die Verwendung des L-15 Mediums insgesamt reproduzierbarer.

Die stärkere Stimulation des Kurzschlußstromes nach Aldosteron bei Verwendung des Nährmediums deutet auf die Abhängigkeit der Aldosteronwirkung vom Substrat- und damit vom Energieangebot hin. Die Substrat- und Energieabhängigkeit der Kurzschlußstromantwort auf Aldosteron wurde mehrfach in anderen Untersuchungen bestätigt (Edelman et al., 1963; Fimognari et al., 1965; Sharp und Leaf, 1964 a und b; Porter und Edelman, 1964; Civan und Hoffman, 1971; Garty et al., 1983). Garty und Mitarbeiter (1983) zeigten, daß die Zugabe von Glukose oder Pyruvat zur Innenbadlösung die stimulierende Wirkung von Aldosteron auf den Kurzschlußstrom verstärkt, wobei Pyruvat das potentere Substrat darstellt. In den Untersuchungen von Sharp und Leaf (1964 a und b) reagierten in Aldosteron inkubierte Harnblasen ebenfalls mit einer weiteren Zunahme des Kurzschlußstromes, wenn den

Badlösungen Pyruvat, Glukose, Laktat oder Oxalazetat zugegeben wurde. Die Reaktion zeigte sich wiederum besonders deutlich bei Verwendung von Pyruvat.

Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen schien Pyruvat in der vorliegenden Arbeit jedoch als Substrat allein nicht auszureichen, um den initialen Funktionszustand der Blasen, der mit durchschnittlichen Potential- und Leitfähigkeitswerten von 50.4 mV bzw. 0.4 mS/cm^2 als normal bezeichnet werden kann, aufrechtzuerhalten. Neben der Verschlechterung der Transporteigenschaften, von der vor allem in Aldosteron inkubierte Harnblasenhälften betroffen waren, fiel auf, daß der relative Kurzschlußstromanstieg nach Aldosteron in den mit Pyruvat durchgeführten Versuchen geringer ausfiel als nach anderen Untersuchungsergebnissen zu erwarten gewesen wäre. Garty und Mitarbeiter (1983) stellten nach einer Übernachtinkubation in Aldosteron z.B. einen mehr als zweifachen Anstieg des Kurzschlußstromes fest, der durch die Zugabe von Pyruvat zur Innenbadlösung nochmals um das 2,5-fache gesteigert wurde. Die geringere Stimulation des Kurzschlußstromes in den eigenen Versuchen mit Pyruvat ist möglicherweise auf die unterschiedliche Versuchsdurchführung zurückzuführen. Garty und Mitarbeiter bestimmten den Kurzschlußstrom und die Leitfähigkeit nur einmal zu Versuchsbeginn. Während der Einwirkzeit von Aldosteron über Nacht aber wurden die Harnblasen einer Natrium-freien Ringerlösung auf der mukosalen Epithelseite ausgesetzt. Erst im Anschluß an die Übernachtinkubation wurde die Badlösung auf der Mukosaseite wieder gegen eine Natriumringerlösung ausgetauscht und der Innenbadlösung Pyruvat zugegeben, um dann den Kurzschlußstrom und die Leitfähigkeit fortlaufend zu bestimmen. Möglicherweise werden die so behandelten Harnblasen weniger stark beansprucht als in der vorliegenden Unter-

suchung, in der der Kurzschlußstrom und die Leitfähigkeit fortlaufend während der gesamten Einwirkzeit von Aldosteron aufgezeichnet wurden. Auch die Natriumfreiheit der Außenbadlösung während der Übernachtinkubation dürfte zur Schonung der Energiereserven des Harnblasengewebes beigetragen haben, so daß sich die Aldosteronwirkung im vollen Umfange zeigen konnte. Inwieweit sich zusätzlich die in den Versuchen von Garty und Mitarbeitern durchgeführte Depolarisation der basolateralen Membran durch die Erhöhung der Kaliumkonzentration im Innenbad auf den Funktionszustand der Harnblasen und damit auf den Aldosteroneffekt auswirkte, läßt sich schwer beurteilen.

Um eine stärkere Wirkung von Aldosteron auf den Kurzschlußstrom zu erhalten, die sich möglicherweise auch in deutlicheren Änderungen der Elementkonzentrationen in den Epithelzellen niederschlägt, wurde das ursprüngliche Versuchsprotokoll abgewandelt. In Anlehnung an die von Eaton (1981) an Kaninchenharnblasen durchgeführten Experimente, in denen die Inkubationslösungen mit Substraten angereichert waren, wurde der Innenbadlösung Leibovitz-Nährmedium (L-15) zugefügt.

Abgesehen von einem kurzfristigen Abfall des Kurzschlußstromes schien das Nährmedium selbst den Kurzschlußstrom nicht weiter zu beeinflussen (vergl. 4.4.1). Die nur etwa 15 bis maximal 30 Minuten währende Eigenwirkung des Nährmediums könnte beispielsweise dadurch bedingt sein, daß die im Medium enthaltenen Substrate durch einen Natrium-Substrat-Cotransport über die basolaterale Membran in die Zellen transportiert werden. Dies würde neben der Substratanreicherung zu einem vorübergehenden Anstieg des intrazellulären Natriumgehaltes führen. Durch die höhere intrazelluläre Natriumkonzentration könnte aber der passive Natriumeintritt an der apikalen Membran und dadurch letztlich auch die Netto-Natriumtransportrate des Epithels, d.h. der

Kurzschlußstrom, vermindert werden. Nach kurzer Zeit werden dann vermutlich zusätzliche Natriumpumpen in die basolaterale Membran inseriert, z.B. durch die energieabhängige Freilegung von bereits vorhandenen, und es stellt sich wieder ein Gleichgewicht zwischen dem ein- und auswärts transportierten Natrium ein, und der Kurzschlußstrom erreicht seinen Ausgangswert. Entsprechend dieser Annahme ergaben die Messungen, die nach einer 30-minütigen Inkubation der Harnblasen im L-15 Medium durchgeführt wurden, keinen Hinweis mehr auf Änderungen der zellulären Elementkonzentrationen.

2 Wirkung von Aldosteron auf die zellulären Natrium- und Kaliumkonzentrationen

Bevor die durch Aldosteron induzierten Änderungen der Natrium- und Kaliumkonzentrationen diskutiert werden, sollen vorab Elementkonzentrationen gegenübergestellt werden, die in anderen Untersuchungen für die Krötenharnblase unter Kontrollbedingungen ermittelt wurden.

Während die eigenen Befunde recht gut mit den mittels der Elektronenstrahlmikroanalyse zu einem früheren Zeitpunkt bestimmten Elementkonzentrationen übereinstimmen (Rick et al., 1978a), gestaltet sich ein direkter Vergleich mit anderen Untersuchungsbefunden schwierig. Im Vergleich zu chemischen Analysen lagen die Natriumkonzentration von 10.0 mmol/kg Feuchtgewicht, die im Mittel aller Epithelzellen unter Kontrollbedingungen gemessen wurde, deutlich niedriger und die mittlere Kaliumkonzentration von 120.5 mmol/kg Feuchtgewicht im Durchschnitt etwas höher (Tab. 6). Die Abweichungen sind besonders groß gegenüber chemischen Werten, die an der intakten Harnblase erhalten wurden (Frazier et al., 1962). Wesentlich kleiner fallen die Unter-

schiede im Vergleich zu chemischen Analysen am isolierten und vom Bindegewebe befreiten Harnblasenepithel aus (Gatzy und Berndt, 1968; Lipton und Edelman, 1971; Macknight et al., 1971 und 1975; Handler et al., 1972).

Tab. 6: Zelluläre Natrium- und Kaliumkonzentrationen im Harnblasenepithel

	Na	K
	mmol/kg Feuchtgewicht	
Elektronenstrahlmikroanalyse	10.0 _a	120.5
	13.0 _b	114.1
Chemische Analyse		
- intakte Harnblase	70.2 _c	—
- isoliertes Harnblasenepithel	44.6 _d	90.1
	42.1 _e	103.5
	29.1 _f	128.0
	27.5 _g	100.5

a = eigene Daten, Mittelwert aller Epithelzellen unter Kontrollbedingungen

b = Rick et al., 1978a

c = Frazier et al., 1962

d = Lipton und Edelman, 1971

e = Macknight et al., 1971 und 1975

f = Handler et al., 1972

g = Gatzy und Berndt, 1968

Vergleichbare Differenzen ergaben sich auch für andere Epithelien. So wurden z.B. an der Froschhaut mittels der Elektronenstrahlsonde deut-

lich niedrigere Natrium- und entsprechend höhere Kaliumkonzentrationen gemessen (Rick et al., 1978b) als sie chemische Analysen für die intakte Froschhaut (Nagel und Dörge, 1971) oder auch für das isolierte Froschhautepithel (Aceves und Erlij, 1971) ergaben. Die Daten der Elektronenstrahlmikroanalyse zeigten dagegen für die Froschhaut eine relativ gute Übereinstimmung mit den Befunden, die mittels chemischer Analysen für isolierte Epithelzellen erhoben wurden (Zylber et al., 1973). Bei diesen Analysen wurden die Epithelzellen für wenige Sekunden in Natrium-freien Lösungen gewaschen, um anhaftendes extrazelluläres Natrium zu entfernen.

Die Differenzen zwischen den eigenen Befunden und denen anderer Untersuchungen an der Krötenharnblase lassen sich wahrscheinlich auf Fehler in der chemischen Analyse zurückführen. Während bei der Elektronenstrahlmikroanalyse intra- und extrazelluläre Elektrolytkonzentrationen anhand des Rasterelektronenbildes und der Spektren (vergl. 3.3.3) gut voneinander unterschieden werden können, erfolgt bei chemischen Verfahren die Bestimmung der intrazellulären Elementkonzentrationen nur indirekt. Dabei wird von der Gesamtmenge der Elektrolyte der extrazelluläre Anteil abgezogen, wobei die Größe des Extrazellularraumes mit Hilfe von Verteilersubstanzen (z.B. Inulin oder Mannitol) bestimmt wird. Da diese Substanzen unterschiedlich große Bereiche des Extrazellularraumes erfassen können (Al-Awqati et al., 1972; Biber et al., 1972; Erlij und Smith, 1973; McIver und Macknight, 1974) und das Harnblasenepithel einem Bindegewebe aufliegt, das oft ein Vielfaches des Epithelvolumens ausmacht, bereitet die Abschätzung der Größe des Extrazellularraumes und damit die genaue Bestimmung der zellulären Elementkonzentrationen Schwierigkeiten.

Für die Froschhaut konnte z.B. nachgewiesen werden, daß bei Verwendung von Inulin die Größe des Extrazellularraumes meist unterschätzt wird, da mit Inulin noch nicht einmal 50 % des gesamten Wassergehaltes der Haut erfaßt werden, obwohl das Bindegewebe mindestens 75 % der Haut ausmacht (Nagel und Dörge, 1971). Aus der Unterschätzung des Extrazellularraumes ergibt sich dann, daß ein großer Teil der extrazellulären Elektrolyte dem Zellraum zugerechnet wird, woraus zu hohe Natrium- und zu niedrige Kaliumwerte resultieren. In Übereinstimmung mit einem möglichen Fehler bei der Bestimmung der Größe des Extrazellularraumes wird die Differenz zu den eigenen Werten umso geringer, je kleiner der extrazelluläre Anteil in der Präparation ist (vergl. Tab. 6). Aber auch bei der Verwendung von isolierten Epithelien wird vermutlich der Anteil der extrazellulären Elementkonzentrationen in den Interzellularspalten häufig unterschätzt, da die Markersubstanzen z.B. durch den Flüssigkeitsstrom weggeschwemmt werden können (Notochin et al., 1965; Grim et al., 1973). Weitere Probleme könnten sich aus dem jeweiligen Isolationsverfahren ergeben. Möglicherweise sind isolierte Epithelien in ihrer Transportfunktion eingeschränkt. Im Vergleich zu dem Abschaben der Epithelzellen (Macknight et al., 1971 und 1975) kann die Abtrennung des Epithels mit Hilfe der enzymatischen Einwirkung von Kollagenase als relativ schonend angesehen werden (Lipton und Edelman, 1971; Gatzky und Berndt, 1968; Handler et al., 1972). Die jeweiligen Elementanalysen zeigen jedoch auch hier eine ziemlich große Streuung der Ergebnisse. Aufgrund der oben dargelegten Schwierigkeiten und Ungenauigkeiten dürften chemische Analysen daher wenig geeignet sein, so geringfügige Änderungen der Elementkonzentrationen, wie sie vermutlich nach Aldosteron in den Epithelzellen auftreten, nachzuweisen. Dies gilt insbe-

sondere für die Analyse der Elementkonzentrationen in der intakten Harnblase. Hier konnte trotz deutlicher Stimulation des Natriumtransportes keine Änderung des zellulären Natriumgehaltes nach Aldosteron ermittelt werden (Handler et al., 1969). Aber auch für das isolierte Harnblasenepithel lassen sich mittels chemischer Analysen nur schwer Aldosteron-induzierte Änderungen der Elementkonzentrationen nachweisen. Während Handler und Mitarbeiter (1972) einen kleinen, aber signifikanten Natriumanstieg und Kaliumabfall nach Aldosteron feststellten, blieben die Elementkonzentrationen nach den Untersuchungen von Lipton und Edelman (1971) unverändert.

Gegenüber chemischen Analysen zeigten Messungen des "Natriumtransportpools", d.h. des von mukosaler Seite her mit Radioisotopen austauschbaren Natriums, etwas deutlichere Tendenzen hinsichtlich der Wirkung von Aldosteron. So wurde in den Zellen von in Aldosteron inkubierten Krötenharnblasen ein höherer Gehalt an radioaktiv markiertem Natrium nachgewiesen als unter Kontrollbedingungen (Crabbé und de Weer, 1969; Leaf und Macknight, 1972). Aber auch diese Methode erlaubt nur eine grobe Abschätzung der durch Aldosteron hervorgerufenen Änderungen der zellulären Natriumkonzentration. Radioaktiv markiertes Natrium könnte z.B. auch in die Interzellularspalten oder das Bindegewebe der Harnblasen gelangt und dort miterfaßt worden sein.

Zur genaueren Bestimmung der Änderungen der zellulären Elementkonzentrationen, insbesondere der Natriumkonzentration, nach Aldosteron verwandte Eaton (1981) in seinen Untersuchungen an der Kaninchenharnblase ionensensitive Mikroelektroden. Vergleichbare Messungen für die Krötenharnblase liegen bisher nicht vor, da die geringe Größe der Epithelzellen ein Messen mit ionensensitiven Mikroelektroden nahezu unmöglich macht. Nach den Angaben von Eaton wird die intrazelluläre

Natriumaktivität durch Aldosteron um etwa das zweieinhalb- bis dreifache gesteigert. Aber auch für die Kaliumaktivität ergab sich nach seinen Messungen eine leichte Zunahme, die er auf eine gesteigerte Aktivität der Na-K-ATPase oder aber auf eine Zellschrumpfung zurückführte. In der vorliegenden Untersuchung war jedoch eher eine Tendenz zur Abnahme der Kaliumkonzentration erkennbar. Einen bedeutend geringeren Anstieg der Natriumaktivität ergaben andere Untersuchungen, die ebenfalls mit ionensensitiven Mikroelektroden an der Kaninchenblase durchgeführt wurden (Wills und Lewis, 1980; Lewis und Wills, 1983). Nach den Angaben dieser Untersucher betrug der durch Aldosteron bewirkte Anstieg der Natriumaktivität in den Zellen weniger als 1 mmol, so daß er nicht signifikant nachgewiesen werden konnte. Da das Epithel der Kaninchenblase als "dichtes" (tight) Epithel vergleichbare Natriumtransportcharakteristika wie die Krötenharnblase aufweist, können die für dieses Präparat aufgezeigten Änderungen der Natriumaktivität auch für die Krötenharnblase angenommen werden. Nach Kalkulationen, die auf der Grundlage von Strom-Spannungsbeziehungen nach der Goldman-Hodgkin-Katz Funktionsgleichung durchgeführt wurden, soll die Natriumaktivität der Krötenharnblase durch Aldosteron um etwa das zweifache gesteigert werden (Palmer et al., 1982; Palmer und Speez, 1986).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Zunahme der zellulären Natriumkonzentration nach Aldosteron mittels der Elektronenstrahlmikroanalyse direkt gemessen und statistisch signifikant nachgewiesen werden. War die Innenbadlösung mit Pyruvat angereichert, nahm die Natriumkonzentration in den Granularzellen des Harnblasenepithels von 10.6 auf 12.3 mmol/kg F.G. (+ 16 %) zu. In den mit L-15 Nährmedium durchgeführten Versuchen war sogar ein Anstieg von 9.1 auf 13.1

mmol/kg F.G. (+ 44 %) für Natrium zu verzeichnen.

Der unter allen Versuchsbedingungen nachgewiesene Anstieg des Natriumgehaltes in den Epithelzellen der Krötenharnblase spricht für die primäre Wirkung von Aldosteron auf die Leitfähigkeit der apikalen Membran für Natrium. Die Aldosteron-induzierte Zunahme der apikalen Leitfähigkeit könnte durch die Aktivierung von Natriumkanälen bedingt sein, die entweder bereits latent in der apikalen Membran vorliegen oder aber aus subapikalen Membranvesikeln rekrutiert werden. Untersuchungen an der Krötenharnblase mittels der Rauschfrequenzanalyse ergaben, daß die gesteigerte Natriumpermeabilität der apikalen Membran unter Aldosteron auf einen entsprechenden Anstieg der Dichte elektrisch erkennbarer Natriumkanäle zurückzuführen ist (Palmer et al., 1982). Eine andere Studie, die an apikalen Membranvesikeln von Gewebekulturen der Amphibienniere (A6-Zellen) durchgeführt wurde, zeigte, daß die Stimulation des Natriumeinstromes unter Aldosteron mit der Methylierung von Membranlipiden oder -proteinen einhergeht (Sariban-Sohraby et al., 1984). Die Methylierung membrangebundener Lipide oder Proteine könnte somit einen möglichen Mechanismus zur Aktivierung der Natriumkanäle in der apikalen Membran darstellen.

Der Befund eines wenige mmol betragenen Natriumanstiegs in den Zellen, der nur mit entsprechend empfindlichen Methoden nachgewiesen werden kann, läßt jedoch vermuten, daß zusätzlich zur apikalen Membran auch die basolaterale Membran durch Aldosteron beeinflusst wird. Diese sekundäre Wirkung von Aldosteron könnte darin bestehen, daß angesichts des erhöhten Natriumeinstromes über die apikale Membran in die Zellen zusätzliche Natriumpumpen in die basolaterale Membran inseriert werden.

Entsprechend dieser Annahme konnte für verschiedene Epithelien (Knox

und Sen, 1974; Schmidt et al., 1975; Katz et al., 1979; Horster et al., 1980; Garg et al., 1981; El Mernissi et al., 1982) ein Anstieg der Na-K-ATPase Aktivität nach Aldosteron festgestellt werden, welcher sekundär gegenüber der Stimulation des apikalen Natriumeinstromes schien (Petty et al., 1981).

Andere Untersuchungsbefunde weisen darauf hin, daß die Wirkung von Aldosteron auf die basolaterale Membran sogar unabhängig von der Wirkung auf die apikale Membran, d.h. direkt erfolgt. So erwies sich die Stimulation der Biosynthese von Pumpenuntereinheiten in der Krötenharnblase insensitive gegenüber dem Diuretikum Amilorid, welches selektiv die Natriumkanäle der apikalen Membran blockiert (Geering et al., 1982).

Trotz all dieser Befunde, die eine indirekte oder direkte Wirkung von Aldosteron auf die basolaterale Membran vermuten lassen, ist die Frage der hormonellen Kontrolle dieses aktiven Transportschrittes für Natrium nicht eindeutig zu beantworten. In Untersuchungen am Colon von Kaninchen und Schildkröten, in welchem die Leitfähigkeit der apikalen Membran für Natrium durch das Antibiotikum Amphotericin maximal erhöht wurde, konnte z.B. keinerlei Wirkung auf die Natriumpumpe festgestellt werden (Frizzell und Schultz, 1978; Halm und Dawson, 1985). Auch die Studien mit Natrium-sensitiven Mikroelektroden an der Kaninchenblase ergaben keinen Hinweis auf Veränderungen der Pumpenkinetik (Lewis und Wills, 1983). Auf der anderen Seite weisen die Abhängigkeit der Aldosteronwirkung von metabolischen Substraten (Edelman et al., 1963; Porter und Edelman, 1964; Sharp und Leaf, 1964 a und b und 1966; Fimognari et al. 1967 a und b), die auch in der vorliegenden Untersuchung durch den Befund einer stärkeren Aldosteronwirkung bei Verwendung des L-15 Nährmediums bestätigt

wurde, und die Stimulation der Enzyme des Zitronensäurezyklus (Kirsten et al., 1968 und 1970) auf die Wirkung des Aldosterons auf den aktiven Natrium-Transportschritt an der basolateralen Membran hin. Da jedoch nach neueren Befunden die Inserierung bzw. Aktivierung von Natriumkanälen in der apikalen Membran ebenfalls metabolisch kontrolliert wird (Palmer et al., 1980; Garty et al., 1983), können diese energetischen Effekte auch als apikale Effekte gedeutet werden. Der bei etwa gleichem Natriumanstieg größere Anstieg des Kurzschlußstromes bei Inkubation der Blasen in L-15 Medium weist auf eine mögliche energieabhängige Rekrutierung von Natriumkanälen hin.

5.3 Vergleich der Wirkung von Aldosteron und AVP auf den Kurzschlußstrom und die zellulären Natriumkonzentrationen

Das antidiuretische Hormon, Argininvasopressin (AVP) besitzt in vielen Epithelien neben seiner Wirkung auf die Wasserpermeabilität auch eine stimulierende Wirkung auf den Natriumtransport (s. Übersichtsartikel von Andreoli und Schafer, 1976 und von Macknight et al., 1980). Dies konnte in den mit AVP durchgeführten Einzelexperimenten bestätigt werden, die eine deutliche Stimulation des Kurzschlußstromes der Krötenharnblase unter der Einwirkung des Hormons zeigten. Gegenüber der Wirkung von Aldosteron wiesen die Kurzschlußstromkurven jedoch einen anderen Zeitverlauf auf. Während die Harnblasen erst nach einer Latenzphase von etwa 30 bis 90 Minuten auf die Aldosterongabe reagierten und eine über mehrere Stunden anhaltende Steigerung des Kurzschlußstromes zu beobachten war, zeigte sich die maximale Wirkung von AVP bereits innerhalb der ersten 10 Minuten, um während der weiteren Inkubationszeit wieder allmählich nachzulassen. Ein ähnlicher Zeitverlauf der Kurzschlußstromstimulation nach AVP wurde bereits in früheren Untersuchungen festgestellt (Leaf und Dempsey, 1960; Lipton und Edelman, 1971; Finn und Krug, 1973).

Auch hinsichtlich der Wirkung der beiden Hormone auf die zellulären Elementkonzentrationen ergaben sich Unterschiede. Während Aldosteron nur einen geringfügigen Anstieg der Natriumkonzentration bewirkte, war unter AVP ein deutlich stärkerer Anstieg der Natriumkonzentration zu verzeichnen. Macknight, Leaf und Civan (1971) und Handler, Preston und Orloff (1972) ermittelten ebenfalls eine Zunahme der Natriumkonzentration unter AVP für das isolierte Harnblasenepithel von *Bufo marinus*, die jedoch von Lipton und Edelman (1971) trotz ähnlicher

Versuchstechnik und gleichem Präparat nicht bestätigt wurde. Möglicherweise beruhen diese unterschiedlichen Befunde auf den bereits oben (vergl. 5.2.2) diskutierten Schwierigkeiten, die sich für chemische Analysen zellulärer Elementkonzentrationen ergeben. Für die Froschhaut wurden zum Teil ähnlich kontroverse Ergebnisse erhalten. Während Aceves und Erlij (1971) für das isolierte Epithel der Froschart *Rana pipiens* keine Änderung des "Natriumtransportpools" feststellten, zeigten andere Untersuchungen an der Froschart *Rana temporaria* eine deutliche Zunahme des von der mukosalen Seite her austauschbaren Natriums (Nielsen, 1982). Eventuell sind diese Unterschiede auch in den verschiedenen Froschspezies begründet. Eine mittels der Elektronenstrahlmikroanalyse durchgeführte Studie (Rick et al., 1984) zeigte z.B. deutlich, daß die intrazelluläre Natriumkonzentration unter Kontrollbedingungen bei *Rana esculenta* deutlich niedriger liegt und auch der Anstieg der zellulären Natriumkonzentration nach AVP weniger stark ausgeprägt ist als bei *Rana temporaria*.

Die in der vorliegenden Arbeit nach AVP parallel zur Kurzschlußstromstimulation beobachtete Zunahme der Natriumkonzentration spricht für die von den meisten Autoren (Curran et al., 1963; Civan und Frazier, 1968; Rawlins et al., 1970; Cereijido und Rotunno, 1971; Civan und DiBona, 1974; Biber und Cruz, 1973; Ferguson und Smith, 1972; Rick et al., 1984, Palmer und Speez, 1986) vertretene Auffassung, daß AVP die Natriumpermeabilität der Außenmembran und damit den Natriumeinstrom in das Epithel erhöht. Entsprechend dieser Annahme kann der AVP-induzierte Anstieg der Natriumkonzentration in der Froschhaut vollständig durch die gleichzeitige Gabe des Diuretikums Amilorid verhindert werden (Rick et al., 1984).

Nach den Ergebnissen der Rauschfrequenzanalyse erhöht das AVP (Li et al., 1982) ähnlich der Wirkung von Aldosteron (Palmer et al., 1982) in der Krötenharnblase die Anzahl der Natriumkanäle in der apikalen Membran. Für die beiden Hormone werden jedoch zwei unterschiedliche Mechanismen zur Steigerung der Dichte der Natriumkanäle angenommen, denn die vorherige Inkubation der mukosalen Blasenseite in Trypsin reduziert die Antwort des Kurzschlußstromes auf Aldosteron, nicht aber die Antwort auf AVP (Garty und Edelman, 1983). Auch die Befunde von Cuthbert und Shum (1975 und 1976) weisen auf einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus der beiden Hormone hin. Während die Amilorid-Bindekapazität der apikalen Membran der Krötenharnblase durch AVP nicht gesteigert wird, beobachteten sie unter Aldosteron eine erhöhte Anzahl an Amilorid-Bindungsstellen, ohne daß sich die Affinität des Gewebes für Amilorid geändert hatte. Da Aldosteron erst nach einer mehrstündigen Inkubationszeit seine maximale Wirkung auf den Kurzschlußstrom zeigt, könnte hier neben der Aktivierung bereits in der apikalen Membran oder in subapikalen Membranvesikeln latenter Natriumkanäle eventuell auch die Neusynthese von Natriumkanälen eine Rolle spielen. Für die Neusynthese von Natriumkanälen unter dem Einfluß von Aldosteron spricht unter anderem der Befund einer gesteigerten Ausbildung Amilorid- oder Triamteren- (Diuretikum, Vorläufer des Amilorids) empfindlicher Natriumkanäle, die im Darm von Hühnern bei einer mehrtägigen natriumarmen Diät, d.h. bei einer erhöhten Aldosteronkonzentration im Serum, nachgewiesen wurde (Bindslev, 1979; Bindslev et al., 1981; Christensen und Bindslev, 1982). Die bereits oben angeführten Versuche von Garty und Edelman (1983) aber, in denen eine verminderte Kurzschlußstromantwort auf Aldosteron bei Inkubation in Trypsin festgestellt wurde, sprechen

gegen die Neusynthese von Natriumkanälen.

Die im Vergleich zur AVP-Wirkung später einsetzende und länger anhaltende Wirkung von Aldosteron wird darauf zurückgeführt, daß nach Angreifen des Aldosteron-Aporezeptor-Komplexes an den Kernrezeptoren (vergl. 2.3) zunächst metabolische Enzyme synthetisiert werden müssen, die dann die Aktivierung und/oder die Neusynthese von Natriumkanälen und damit die apikale Leitfähigkeit kontrollieren (Garty et al., 1983). Tatsächlich induziert Aldosteron eine Reihe von Enzymen, von denen eines als Zitratsynthetase identifiziert wurde (Kirsten et al., 1968; Law und Edelman 1978, a und b). Demgegenüber konnte bei der Stimulation des Natriumtransportes durch AVP keine Aktivierung der Enzyme des Zitronensäurezyklus festgestellt werden (Kirsten et al., 1970). Die Wirkung von AVP auf die apikale Membranleitfähigkeit scheint somit weniger energieabhängig zu sein. Dementsprechend zeigte sich die maximale stimulierende Wirkung von AVP auf den Kurzschlußstrom bereits innerhalb kürzester Zeit, ohne daß den Badlösungen Substrate beigelegt werden mußten.

Heute wird allgemein angenommen, daß das AVP sich an Rezeptoren der basolateralen Membran bindet (Bockaert et al., 1972), dadurch eine Aktivierung der Adenylcyclase bewirkt (Bar et al., 1970; Hynie und Sharp, 1970; Skorecki et al., 1986), und die zelluläre Konzentration an cyclischem AMP (cAMP) ansteigt (Orloff und Handler, 1967; Stoff et al., 1972; Omachi et al., 1974). Die daraus resultierende Aktivierung der Proteinkinase (Dousa und Valtin, 1976) führt dann über eine Reihe noch unbekannter Zwischenschritte, die möglicherweise die Dephosphorylierung von Membranproteinen beinhalten (Walton et al., 1975), zu einem Anstieg der apikalen Leitfähigkeit.

Untersuchungen, in denen eine zusätzliche Steigerung des Kurzschluß-

stromes von in Aldosteron inkubierten Harnblasen durch AVP beobachtet wurde (Crabbé, 1963; Sharp und Leaf, 1966; Fanestil et al., 1967; Handler et al., 1969) sprechen gleichfalls für einen zumindest teilweise unterschiedlichen Wirkungsmechanismus der beiden Hormone. Aldosteron allein beeinflusst nicht die Adenylzyklase (Lang und Edelman, 1972). Erst die zusätzliche Gabe von AVP führt zu einem Anstieg der zellulären Konzentration an cAMP, der durch eine verminderte Phosphodiesteraseaktivität unter dem Einfluß von Aldosteron erklärt werden kann (Stoff et al., 1972 und 1973; Orloff et al., 1973).

Einige Autoren führen die additive Wirkung von Aldosteron und AVP darauf zurück, daß durch die Hormone der Natriumtransport in unterschiedlichen Zelltypen stimuliert wird. Aus der Abhängigkeit des Aldosteron-stimulierten Natriumtransportes vom Energiemetabolismus und aus der Anwesenheit mitochondrienreicher Zellen im Harnblasenepithel wurde gefolgert, daß vor allem dieser Zelltyp für die natriferische Wirkung von Aldosteron verantwortlich ist (Sharp und Leaf, 1966). Für das Froschhautepithel wurde z.B. die Stimulation der mitochondrienreichen Zellen unter Aldosteron nachgewiesen (Vouité et al., 1974), wohingegen die Natriumtransportprozesse in den Granulärzellen unbeeinflusst blieben (Maetz et al., 1958; Eigler, 1970). Das Ausmaß der Kurzschlußstromstimulation unter Aldosteron aber läßt es kaum als möglich erscheinen, daß ein Zelltyp, der weniger als 10 Prozent der gesamten Epithelzellmasse ausmacht (vergl. 4.1), allein für die stimulierende Wirkung von Aldosteron verantwortlich ist. Dies konnte durch die eigenen Meßdaten bestätigt werden, denn die Mehrzahl der mitochondrienreichen Zellen, die aufgrund ihrer ähnlichen Elementzusammensetzung mit den schleimproduzierenden Zellen in einer Gruppe

zusammengefaßt wurden (vergl. 4.1), zeigte keine Änderung ihrer zellulären Natriumkonzentrationen. Ein Anstieg des Natriumgehaltes war vor allem in den Granularzellen zu verzeichnen, aber auch einige Basalzellen schienen an der natriferischen Wirkung von Aldosteron beteiligt zu sein. Möglicherweise haben sich die Basalzellen, in denen kein Natriumanstieg nachgewiesen werden konnte, funktionell aus dem epithelialen Zellverband entkoppelt. Die Entkoppelung tiefer gelegener Zellagen wurde z.B. im mehrschichtigen Froschhautepithel unter bestimmten Versuchsbedingungen bei Langzeitinkubation beobachtet (Rick et al., 1984).

Den eigenen Daten nach zu urteilen scheint sich aber nicht allein die Wirkung von Aldosteron, sondern auch die von AVP auf die Granular- und Basalzellen des Blasenepithels zu beschränken. Ähnliches gilt für das Froschhautepithel, denn auch hier konnten mittels der Elektronenstrahlmikroanalyse weder in den mitochondrienreichen- noch in den Drüsenzellen AVP-induzierte Änderungen der Elementkonzentrationen festgestellt werden (Rick et al., 1978b und 1984). Morphologische Veränderungen, wie die Zunahme des Zellvolumens (DiBona und Civan, 1969) oder die Ausbildung zusätzlicher Mikrovillistrukturen (LeFurgey und Tisher, 1981), die nur in den Granularzellen, nicht aber in den mitochondrienreichen Zellen der Krötenharnblase unter AVP beobachtet wurden, bestätigen die Annahme der primären Wirkung von AVP auf die Granularzellen. Im Gegensatz dazu stellten Scott und Mitarbeiter (1974) eine Zunahme des Gehaltes an cAMP in den mitochondrienreichen- und nicht in den Granularzellen fest. Es wird vermutet, daß cAMP unter dem Einfluß von AVP zwar in den mitochondrienreichen Zellen synthetisiert wird, von dort aber zu den anliegenden Granularzellen diffundiert, in denen es seine physiologische Wirkung entwickelt

(Goodman et al., 1975).

Da für die natriiferische Wirkung sowohl von AVP als auch von Aldosteron wahrscheinlich in erster Linie die Granularzellen verantwortlich sind, müßte ein unterschiedlicher Wirkungsmechanismus der beiden Hormone, falls vorhanden, in diesem Zelltyp lokalisiert sein. Der trotz deutlicher Kurzschlußstromstimulation unter Aldosteron vergleichsweise geringe Anstieg der Natriumkonzentration in den Granularzellen läßt vermuten, daß die Wirkung dieses Hormons in einer annähernd gleich starken Stimulation der Natriumpermeabilität der apikalen Membran und des aktiven Natriumtransportes an der basolateralen Membran besteht. Die Wirkung von AVP hingegen scheint weitgehend auf die apikale Membran beschränkt, denn hier war insbesondere zu dem Zeitpunkt der maximalen Kurzschlußstromstimulation (10 min nach Hormongabe) eine drastische Zunahme des Natriumgehaltes (+ 254 %) in den Granularzellen zu verzeichnen. Die nach einer längeren Inkubationszeit in AVP etwas weniger stark ausgeprägte Erhöhung der zellulären Natriumkonzentration (+ 70 %) ist möglicherweise dadurch bedingt, daß das vermehrt in die Zelle einströmende Natrium im Sinne einer Selbstinhibition (Finn und Krug, 1973; Garty und Lindemann, 1984) dem weiteren Natriumeinstrom entgegenwirkt. Eventuell wird dieser Selbstinhibitionsmechanismus unter dem Einfluß von AVP vorübergehend ausgeschaltet oder zumindest abgeschwächt. Dies wurde z.B. aus Untersuchungen mit AVP an der Froschhaut gefolgert (Rick et al., 1984).

Eine andere Möglichkeit der Erklärung des bei längerer Inkubationszeit in AVP beobachteten schwächeren Natriumanstieges wäre, daß das über die apikale Membran vermehrt einströmende Natrium sekundär zu einer Stimulierung der Pumpe führt. Andere Untersuchungen weisen auch

auf eine direkte Beeinflussung des aktiven Transportschrittes durch AVP hin (Finn, 1968 und 1971; Janacek und Rybova, 1970; Lipton und Edelman, 1971; Morel und Bastide, 1965; Aceves und Erij, 1971; Aceves, 1977 und Lau et al., 1981).

Falls die Wirkung von AVP in einer Beeinflussung des aktiven Transportschrittes an der basolateralen Membran besteht, scheint dieser jedoch nicht in dem gleich starken Maße beeinflusst zu werden wie durch Aldosteron. Selbst bei einer längeren Inkubationszeit mit AVP lag die Natriumkonzentration noch deutlich höher als bei Aldosteron.

Zusammenfassend ergibt sich für die natriferische Wirkung der beiden Hormone folgendes Bild: Beide Hormone steigern die apikale Leitfähigkeit der Epithelzellen, insbesondere der Granularzellen, für Natrium, möglicherweise durch die unterschiedliche Aktivierung hormonspezifischer Natriumkanäle. Da Aldosteron im allgemeinen eine stärkere Kurzschlußstromstimulation bewirkte als AVP, die zelluläre Natriumkonzentration jedoch nicht in dem entsprechenden Umfang mitanstieg, wird durch Aldosteron offensichtlich zusätzlich der aktive Natriumtransportschritt an der basolateralen Membran stimuliert. Unter der Voraussetzung, daß auch das antidiuretische Hormon neben seiner Wirkung auf die apikale Membranleitfähigkeit eine sekundäre, wenn auch bei weitem geringere Wirkung auf die Natriumpumpe der basolateralen Membran zeigt, scheint es innerhalb des zellulären Wirkungsmechanismus von Aldosteron eine zusätzliche Komponente zu geben.

Die stärkeren Aldosteroneffekte in den mit L-15 Nährmedium durchgeführten Versuche weisen auf die Abhängigkeit des Wirkungsmechanismus von Aldosteron von dem Substrat- und Energieangebot in den Zellen hin. Möglicherweise werden die apikale Leitfähigkeit und der aktive Natriumtransport an der basolateralen Membran metabolisch kontrol-

liert und so aufeinander abgestimmt, daß trotz deutlicher Stimulation des Natriumtransportes durch das Epithel die zellulären Natriumkonzentrationen unter dem Einfluß von Aldosteron nur wenig verändert werden.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Aldosteron auf den transepithelialen Natriumtransport der Harnblase von Kröten (*Bufo marinus*) untersucht, um weitere Aufschlüsse über den Natriumtransportmechanismus und dessen Beeinflussung durch das Hormon der Nebennierenrinde zu erhalten.

Neben der Aufzeichnung transepithelialer elektrischer Parameter, wie Kurzschlußstrom und transepithelialer Leitfähigkeit, mittels der von Ussing und Zehran (1951) eingeführten Kurzschlußstrommethode wurden die Elektrolytkonzentrationen, insbesondere die Natriumkonzentrationen, in den Epithelzellen der Harnblase mittels der Elektronenstrahlmikroanalyse bestimmt. Die Analyse wurde an etwa 1 μ m dicken gefriergetrockneten Kryoschnitten der Harnblase in einem Rasterelektronenmikroskop durchgeführt, das mit einem energiedispersiven Röntgendetektor ausgestattet war.

Das Mineralcorticoid Aldosteron zeigte unter allen Versuchsbedingungen eine stimulierende Wirkung auf die als Kurzschlußstrom gemessene transepitheliale Natriumtransportrate. Parallel zur Kurzschlußstromstimulation war eine leichte Zunahme der Leitfähigkeit des Epithels festzustellen.

Die stimulierende Wirkung von Aldosteron auf den Kurzschlußstrom zeigte sich besonders deutlich, wenn die Kröten drei bis fünf Tage vor Versuchsbeginn in 1/2 oder 1/1 isotonen Kochsalzlösungen gehalten worden waren. Durch die Inkubation der Serosaseite der Harnblasen in einer mit L-15 Nährmedium (Leibovitz) angereicherten Badlösung konnte die Antwort des Kurzschlußstromes auf Aldosteron zusätzlich gesteigert werden. Auch der Aldosteron-induzierte Anstieg der zellulären

Natriumkonzentrationen fiel in den mit L-15 Nährmedium durchgeführten Versuchen deutlicher aus.

Der unter allen Versuchsbedingungen geringe, aber nachweisbare Anstieg der Natriumkonzentrationen nach Aldosteron, der in den Granular- und zum Teil auch in den Basalzellen des Blasenepithels zu verzeichnen war, deutet auf die primäre Wirkung des Hormons auf die Natrium-Permeabilität der apikalen Membran in diesen Zellen hin.

Im Vergleich zu der natriurerischen Wirkung des antidiuretischen Hormons der Neurohypophyse (Argininvasopressin, AVP) aber, scheint die Wirkung von Aldosteron nicht allein in der Steigerung des passiven Natriumeinstromes in die Zellen durch die apikale Membran zu bestehen. Während Aldosteron, vor allem bei Verwendung des L-15 Nährmediums, trotz mehrfacher Steigerung des Kurzschlußstromes nur zu geringfügigen Änderungen der zellulären Natriumkonzentrationen führte, war nach AVP bei einer deutlich geringeren Kurzschlußstromstimulation ein drastischer Anstieg des zellulären Natriumgehaltes festzustellen. Der nach AVP nachgewiesene Natriumanstieg, der sich in den Granular- und auch einigen Basalzellen besonders deutlich zum Zeitpunkt der maximalen Kurzschlußstromstimulation (10 min nach AVP-Gabe) zeigte, entspricht der allgemein vertretenen Auffassung, daß die Wirkung von AVP auf den transepithelialen Natriumtransport in erster Linie auf eine Erhöhung der Natriumleitfähigkeit der apikalen Membran zurückzuführen sei. Demgegenüber läßt der bedeutend geringere Anstieg der zellulären Natriumkonzentrationen nach Aldosteron vermuten, daß durch Aldosteron zusätzlich zu dem passiven Natriumeinstrom durch die apikale Membran der aktive Natriumtransport durch die basolaterale Membran gesteigert wird.

Die Steigerung der natriurerischen Wirkung von Aldosteron durch die

Verwendung des L-15 Nährmediums im Innenbad der Harnblasen deutet auf eine Abhängigkeit der Wirkung von Aldosteron vom Substrat- und Energieangebot in den Epithelzellen hin.

7. LITERATUR

Aceves, J.:

Sodium pump stimulation by oxytocin and cyclic AMP in the isolated epithelium of frog skin.

Pflügers Arch. 371:211-216 (1977)

Aceves, J. und D. Erlij:

Sodium transport across the isolated epithelium of the frog skin.

J. Physiol. 212:195-210 (1971)

Addison, T.:

Mineralcorticoid receptors in target tissues.

In: On the constitutional and local effect of diseases of the suprarenal capsules. Highley, London (1855)

Agar, A.W., R.H. Alderson und D. Chescoe:

Principles and practice of electron microscope operation.

In: Practical methods in electron microscopy. Vol. 2 (Hrsg. A.M. Glauret) North Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford S.98-105 (1974)

Al-Awqati, Q., A. Leaf, A.D.C. Macknight und M.M. Civan:

Intracellular composition and transepithelial transport: Inulin as a potential source of experimental error.

J. Clin. Invest. 51:2a (1972)

Andreoli, T.E. und J.A. Schafer:

Mass transport across cell membranes: The effects of antidiuretic hormone on water and solute flows in epithelia.

Ann. Rev. Physiol. 38:451-500 (1976)

Appleton, T.C.:

Physiology and pharmacology at a sub-cellular level.

In: Microprobe analysis in biology and medicine. (Hrsg. P. Echlin und R. Kaufmann) S. Hirzel Verlag, Stuttgart (1978) S. 1-10

Asano, Y., Y. Tashima, H. Matsui, K. Nagano und M. Nakao:

(Na-K)-ATPase from the frog bladder and its relationship to sodium transport.

Biochim. Biophys. Acta 219:169-178 (1970)

Bahr, G.F., F.B. Johnson und G. Zeitler:

Elementary composition of organic objects after electron irradiation. Lab. Invest. 14:1115-1127 (1965)

Bar, H., O. Hechter, I.L. Schwartz und R. Walter:

Neurohypophyseal hormone-sensitive adenylcyclase of toad urinary bladder.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA):7-12 (1970)

Bauer, R. und R. Rick:

A computer program for the analysis of low energy X-ray spectra.

In: Microprobe analysis in biology and medicine. (Hrsg. P. Echlin und R. Kaufmann) S. Hirzel Verlag, Stuttgart, S. 205-216 (1978)

Baumann, E.J. und S. Kurland:

Changes in inorganic constituents of blood in suprarenalectomized cats and rabbits.

J. Biol. Chem. 71:281-302 (1927)

Beck, F.X., R. Bauer, U. Bauer, J. Mason, A. Dörge, R. Rick und K. Thureau:

Electron microprobe analysis of intracellular elements in the rat kidney.

Kidney Int. 17:756-763 (1980)

Beck, F.X., A. Dörge, J. Mason, R. Rick und K. Thureau:

Element concentrations of renal and hepatic cells under potassium depletion.

Kidney Int. 22:250-256 (1982)

Bentley, P.J.:

Amiloride: A potent inhibitor of sodium transport across toad bladder.

J. Physiol. 195:317-330 (1968)

Biber, T.U.L.:

Effects of changes in transepithelial transport on the uptake of sodium across the outer surface of the frog skin.

J. Gen. Physiol. 58:131-144 (1971)

Biber, T.U.L. und L.J. Cruz:

Effect of antidiuretic hormone on sodium uptake across outer surface of frog skin.

Am. J. Physiol. 225:912-917 (1973)

Biber, T.U.L. und M.L. Sanders:

Influence of transepithelial potential difference on the sodium uptake at the outer surface of the isolated frog skin.

J. Gen. Physiol. 61:529-551 (1973)

Biber, T.U.L., J. Aceves und L.J. Mandel:

Potassium uptake across serosal surface of isolated frog skin epithelium.

Am. J. Physiol. 222:1366-1373 (1972)

Bindslev, N.:

Sodium transport in the hen lower intestine. Induction of sodium sites in the brush border by a low-sodium diet.

J. Physiol. 288:449-466 (1979)

Bindslev, N., A.W. Cuthbert, J.M. Edwardson und E. Skadhauge:

Kinetics of amiloride action in the hen coprodaeum in vitro.

Pfügers Arch. 392:340-346 (1982)

Birks, R.I. und D.F. Davey:

Osmotic responses demonstrating the extracellular character of the sarcoplasmic reticulum.

J. Physiol. 202:171-188 (1969)

Bishop, W.R., M.W. Mumbach und B.T. Scheer:

Interrenal control of active sodium transport across frog skin.
Am. J. Physiol. 200:451-453 (1961)

Bockaert, J., M. Imbert, S. Jard und F. Morel:

3H-oxytocin binding sites in the isolated frog skin epithelium:
Relation to the physiological response.
Molec. Pharmacol. 8:230-240 (1972)

Bonnet, R.:

Über die "Schlußleisten" der Epithelien.
Dt. Med. Wochenschr. (Vereinsbeilage) 21:58 (1895)

Bonting, S.L. und M.R. Canady:

Na-K activated adenosine triphosphate and sodium transport in toad bladder.
Am. J. Physiol. 207:1005-1009 (1964)

Bonting, S.L. und L. Caravaggio:

Studies on Na-K-activated adenosine triphosphatase. V. Correlation of enzyme activity with cation flux in six tissues.
Arch. Biochem. Biophys. 101:37-46 (1963)

Boulpaep, E.L.:

Electrical phenomena in the nephron.
Kidney Int. 9:88-102 (1976)

Boulpaep, E.L.:

Electrical properties of individual membranes of proximal renal tubule cells.
In: Renal Function (Hrsg. G.H. Giebisch und E.F. Purcell), Josiah Macy Jr. Found., New York, S. 149-164 (1977)

Boulpaep, E.L. und J.F. Seely:

Electrophysiology of proximal and distal tubules in the autoperfused dog kidney.
Am. J. Physiol. 221:1084-1096 (1971)

Brinley, F.J., T. Tiffert, A. Scarpa und L.J. Mullins:

Intracellular calcium buffering capacity in isolated squid axons.
J. Gen. Physiol. 70:355-384 (1977)

Candia, O.A. und J.A. Zadunaisky:

Potassium flux and sodium transport in the isolated frog skin.
Biochim. Biophys. Acta 255:517-529 (1972)

Carstensen, H., C.A.J. Bergers und C.H. Li:

Demonstration of aldosterone and corticosterone as the principal steroids formed in incubates of adrenals of the American bullfrog and stimulation of their production by mammalian adrenocorticotropin.
Gen. Comp. Endocrinol. 1:37-50 (1961)

Castel, M., A. Sahar und D. Erij:

Extracellular route for passive permeation in choroid plexus epithelium.
Isr. J. Med. Sci. 8:1762 (1972)

- Cereijido, M., F. Herrera, W.J. Flanigan und P.F. Curran:
The influence of Na concentration on Na-transport across frog skin.
J. Gen. Physiol. 47:879-893 (1964)
- Cereijido, M.F. und C.A. Rotunno:
The effect of antidiuretic hormone on the movement across frog skin.
J. Physiol 213:119-133 (1971)
- Chance, B.:
The energy-linked reaction of calcium with mitochondria.
J. Biol. Chem. 240:2729-2748 (1965)
- Choi, J.K.:
The fine structure of the urinary bladder of the toad (*Bufo marinus*).
J. Cell Biol. 16:53-59 (1963)
- Christensen, O. und N. Bindslev:
Fluctuation analysis of short-circuit current in a warm-blooded sodium retaining epithelium: Site current, density and interaction with triamterene.
J. Membrane Biol. 65:19-30 (1982)
- Civan, M.M. und D.R. DiBona:
Pathways for movement of ions and water across toad urinary bladder.
II. Site and mode of action of vasopressin.
J. Membrane Biol. 19:195-220 (1974)
- Civan, M.M. und H.S. Frazier:
The site of the stimulating action of vasopressin on sodium transport in toad bladder.
J. Gen. Physiol. 51:589-605 (1968)
- Civan, M.M. und R.E. Hoffman:
Effect of aldosterone on the electrical resistance of toad bladder.
Am. J. Physiol. 220:324-328 (1971)
- Claude, P. und D.A. Goodenough:
Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia.
J. Cell Biol. 58:390-400 (1973)
- Cortas, N. und M. Walser:
(Na-K)-activated ATPase in isolated mucosal cells of toad bladder.
Biochim. Biophys. Acta 249:181-187 (1971)
- Crabbé, J.:
Stimulation of active sodium transport across the isolated toad bladder after injection of aldosterone to the animal.
Endocrin. 69:673-682 (1961a)
- Crabbé, J.:
Stimulation of active sodium transport by the isolated toad bladder with aldosterone in vitro.
J. Clin. Invest. 40:2103-2110 (1961b)

Crabbé, J.:

Site of action of aldosterone on the bladder of the toad.

Nature 200:797-798 (1963)

Crabbé, J.:

Suppression by amphotericin B of the effect exerted by aldosterone on active sodium transport.

Arch. Int. Physiol. Biochim. 75:342-345 (1967)

Crabbé, J.:

Does aldosterone modify the response of target tissues to amiloride?

In: Amiloride and epithelial sodium transport. (Hrsg. A.W. Cuthbert, G.M. Fanelli, jr. und A. Scriabine) Urban und Schwarzenberg, Baltimore, S. 91-99 (1979)

Crabbé, J. und P. DeWeer:

Action of aldosterone on the bladder and skin of the toad.

Nature 202: 298-299 (1964)

Crabbé, J. und P. DeWeer:

Relevance of sodium transport pool measurements in toad bladder tissue for the elucidation of the mechanism whereby hormones stimulate active sodium transport.

Pflügers Arch. 313:197-221 (1969)

Crabbé, J., E.N. Ehrlich und J. Scarlatta:

Amiloride and the mode of action of aldosterone on sodium transport across toad bladder and skin.

Pflügers Arch. 304:284-296 (1968)

Cruz, L.J. und T.U.L. Biber:

Transepithelial transport kinetics and Na entry in frog skin: Effects of novobiocin.

Am. J. Physiol. 231:1866-1874 (1976)

Curran, P.F. und M. Cereijido:

K-fluxes in frog skin.

J. Gen. Physiol. 48:1011-1033 (1965)

Curran, P.F., F.C. Herrera und W.J. Flanigan:

The effect of Ca and antidiuretic hormone on Na transport across frog skin. II. Sites and mechanism of action.

J. Gen. Physiol. 46:1011-1027 (1963)

Cuthbert, A.W. und W.K. Shum:

Amiloride and the sodium channel.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 281:261-269 (1974)

Cuthbert, A.W. und W.K. Shum:

Effects of vasopressin and aldosterone on amiloride binding in toad bladder epithelial cells.

Proc. R. Soc. London (B) 189:543-575 (1975)

Cuthbert, A.W. und W.K. Shum:

Characteristics of the entry process for sodium in transporting epithelia as revealed with amiloride.

J. Physiol. 255:587-604 (1976)

Danon, D., J.M. Strum und I.S. Edelman:

The membrane surfaces of the toad bladder: Scanning and transmission electron-microscopy.

J. Membrane Biol. 16:279-295 (1974)

DiBona, D.R. und M.M. Civan:

Toad urinary bladder: Intercellular spaces.

Science 165:503 (1969)

DiBona, D.R., M.M. Civan und A. Leaf:

The anatomic site of transepithelial permeability barriers of toad bladder.

J. Cell Biol. 40:1-8 (1969a)

DiBona, D.R., M.M. Civan und A. Leaf:

The cellular specificity of vasopressin on toad urinary bladder.

J. Membrane Biol. 1:79-99 (1969b)

Dörge, A. und W. Nagel:

Effect of amiloride on sodium transport in the frog skin: II. Sodium transport pool and unidirectional fluxes.

Pflügers Arch. 321:91-101 (1970)

Dörge, A., K. Gehring, W. Nagel und K. Thureau:

Intracellular Na-K-concentration of frog skin at different states of Na transport.

In: Microprobe analysis as applied to cells and tissues. (Hrsg. T.

Hall, P. Echlin und R. Kaufmann) Academic Press, London, New York, S.

337-350 (1974)

Dörge, A., R. Rick, K. Gehring, J. Mason und K. Thureau:

Preparation applicability of freeze-dried sections in the microprobe analysis of biological soft tissue.

J. Microsc. Biol. Cell 22:205-214 (1975)

Dörge, A., R. Rick und E. v. Arnim:

Action of Bay g 2821 on transepithelial sodium transport of frog skin.

Pharmatherapeutica 1/6:341-352 (1977)

Dörge, A., R. Rick, K. Gehring und K. Thureau:

Preparation of freeze-dried cryosections for quantitative X-ray microanalysis of electrolytes in biological soft tissues.

Pflügers Arch. 373:85-97 (1978)

Doucet, A. und A.I. Katz:

Short-term effect of aldosterone on Na-K-ATPase in single nephron segments.

Am. J. Physiol. 241:273-278 (1981)

Dousa, T.P. und H. Valtin:

Cellular actions of vasopressin in the mammalian kidney.

Kidney Int. 10:46-63 (1975)

DuBois-Reymond, E.:

Untersuchungen über tierische Elektrizität.

Berlin (1848)

Eaton, D.C.:

Intracellular sodium ion activity and sodium transport in rabbit urinary bladder.

J. Physiol. 316:527-544 (1981)

Edelman, I.S., R. Bogoroch und G.A. Porter:

On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport: The role of protein synthesis.

Proc. Natl. Acad. Sci. 50:1169-1177 (1963)

Eigler, J.:

Der Einfluß von Aldosteron auf den Natriumtransport und den transepithelialen Wasserfluß durch die isolierte Bauchhaut von *Rana temporaria*.

Pflügers Arch. 317:236-251 (1970)

Eigler, J., J. Kelter und E. Renner:

Wirkungscharakteristika eines neuen Acylguanidins-Amilorid-HCl (MK 870) an der isolierten Haut von Amphibien.

Klin. Wochenschr. 14:737-738 (1967)

ElMernissi, G., D. Chabardes, A. Doucet, A. Hus-Cithard, M. Imbert-Teboui, F. LeBouffant, M. Montegut, S. Siaume und F. Morel:

Changes in tubular basolateral membrane markers after chronic DOCA treatment.

Am. J. Physiol. 245:100-109 (1982)

Engbaek, L. und T. Hoshiko:

Electrical potential gradients through the frog skin.

Acta Physiol. Scand. 39:384-385 (1957)

Erlj, D. und A. Martinez-Palomo:

Opening of tight junctions in frog skin by hypertonic urea solutions.

J. Membrane Biol. 9:220-240 (1972)

Erlj, D. und A. Martinez-Palomo:

Opening of tight junctions in toad urinary bladders by hypertonic solutions.

Fed. Proc. 32:218 (1973)

Erlj, D. und A. Martinez-Palomo:

Role of tight junctions in epithelial function.

In: Membrane transport in biology. Transport across multi-membrane systems.

(Hrsg. G. Giebisch, D.C. Tosteson und H.H. Ussing) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 27-54 (1978)

Erlij, D. und M.W. Smith:

Sodium uptake by frog skin and its modification by inhibitors of transepithelial sodium transport.

J. Physiol. 228:221-239 (1973)

Essig, A.:

Active sodium transport in toad bladder despite removal of serosal potassium.

Am. J. Physiol. 208:401-406 (1965)

Essig, A. und A. Leaf:

The role of potassium in active transport of sodium by the toad bladder.

J. Gen. Physiol. 46:505-515 (1963)

Fanestil, D.D. und C.S. Park:

Steroid hormones and the kidney.

Ann. Rev. Physiol. 43:637-649 (1981)

Fanestil, D.D., G.A. Porter und I.S. Edelman:

Aldosterone stimulation of sodium transport.

Biochim. Biophys. Acta 135:74-88 (1967)

Farquhar, M.G. und G.E. Palade:

Junctional complexes in various epithelia.

J. Cell Biol. 17:375-412 (1963)

Farquhar, M.G. und G.E. Palade:

Cell junction in amphibian skin.

J. Cell Biol. 26:263-291 (1965)

Farquhar, M.G. und G.E. Palade:

Adenosine triphosphatase localization in amphibian epidermis.

J. Cell Biol. 30:359-379 (1966)

Farrell, G.L., P.C. Royce, E.W. Rauschkolb und H. Hirschmann:

Isolation and identification of aldosterone from adrenal venous blood.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87:141-143 (1954)

Ferguson, D.R. und M.W. Smith:

Direct measurement of sodium uptake by toad bladder mucosal cells.

J. Endocrinol. 55:195-201 (1972)

Fimognari, G.M., G.A. Edelman und I.S. Edelman:

The rôle of tricarboxylic acid cycle in the action of aldosterone on sodium transport.

Biochim. Biophys. Acta 135:89-99 (1967a)

Fimognari, G.M., D.K. Kasbekar und I.S. Edelman:

Role of pyruvate metabolism in the action of aldosterone.

Fed. Proc. 24:344 (1965)

Fimognari, G.M., G.A. Porter und I.S. Edelman:

Induction of RNA and protein synthesis in the action of aldosterone in the rat.

Am. J. Physiol. 213:954-962 (1967)

Finkelstein, A.:

Electrical excitability of isolated frog skin and toad bladder.

J. Gen. Physiol. 47:545-565 (1964)

Finn, A.L.:

Separate effects of sodium and vasopressin on the sodium pump in toad bladder.

Am. J. Physiol. 215:849-856 (1968)

Finn, A.L.:

The kinetics of sodium transport in the toad bladder. II. Dual effects of vasopressin.

J. Gen. Physiol. 57:349-362 (1971)

Finn, A.L.:

Transepithelial potential difference in toad urinary bladder is not due to ionic diffusion.

Nature 250:495-496 (1974)

Finn, A.L. und E.F. Krug:

Control of vasopressin stimulation of sodium transport in the toad bladder.

Am. J. Physiol. 224:1018-1023 (1973)

Finn, A.L. und H.N. Nellans:

The kinetics and distribution of potassium in the toad bladder.

J. Membrane Biol. 8:189-203 (1972)

Franz, T.J. und J.T. van Bruggen:

Hyperosmolarity and the net transport of nonelectrolytes in frog skin.

J. Gen. Physiol. 50:933-949 (1967)

Frazier, H.S. und A. Leaf:

The electrical characteristics of active sodium transport in the toad bladder.

J. Gen. Physiol. 46:491-503 (1962)

Frizzell, R.A. und S.G. Schultz:

Ionic conductances of extracellular shunt pathway in rabbit ileum:

Influence of shunt on transmural Na transport and electrical potential differences.

J. Gen. Physiol. 59:318-346 (1972)

Frizzell, R.A. und S.G. Schultz:

Effect of aldosterone on ion transport by rabbit colon in vitro.

J. Membrane Biol. 39:1-26 (1978)

Frömter, E.:

The route of passive ion movement through the epithelium of necturus gallbladder.

J. Membrane Biol. 8:259-301 (1972)

Frömter, E. und B. Gebler:

Electrical properties of amphibian urinary bladder epithelia. III The cell membrane resistances and the effect of amiloride.

Pflügers Arch. 371:99-108 (1977)

Fuhrmann, F.A. und H.H. Ussing:

A characteristic response of the isolated frog skin potential to neurophysiophysial principles and its relation to the transport of sodium and water.

J. Cell. Comp. Physiol. 38:109-130 (1951)

Fujita, M., H. Ohta, K. Kawai, H. Matsui und N. Nakao:

Differential isolation of microvillous and basolateral plasma membranes from intestinal mucosa: Mutually exclusive distribution of digestive enzymes and ouabain-sensitive ATPase.

Biochim. Biophys. Acta 274:336-347 (1972)

Fukuda, T.R.:

Über die Bedingungen für das Zustandekommen des Asymmetriepotentials der Froschhaut.

Jap. J. Med. Sci. Biophys. 8:123-125 (1942)

Galeotti, G.:

Über die elektromotorischen Kräfte, welche an der Oberfläche tierischer Membranen bei der Berührung mit verschiedenen Elektrolyten zustandekommen.

Z. Pys. Chem. 49:542-562 (1904)

Garg, L.C., M.A. Knepper und M.B. Burg:

Mineralcorticoid effects on Na-K-ATPase in individual nephron segments.

Am. J. Physiol. 240:536-544 (1981)

Garty, H. und I.S. Edelman:

Amiloride-sensitive trypsinization of apical sodium channels.

J. Gen. Physiol. 81:785-803 (1983)

Garty, H., I.S. Edelman und B. Lindemann:

Metabolic regulation of apical sodium permeability in toad urinary bladder in the presence and absence of aldosterone.

J. Membrane Biol. 74:15-24 (1983)

Garty, H. und B. Lindemann:

Feedback inhibition of sodium uptake in H-depolarized toad urinary bladders.

Biochim. Biophys. Acta 771:89-94 (1984)

Gatzky, J.T. und W.O. Berndt:

Isolated epithelial cells of the toad bladder. Their preparation, oxygen consumption and electrolyte content.

J. Gen. Physiol. 51:770-784 (1968)

Geering, K., M. Girardet, C. Bron, J.P. Kraehenbuhl und B.C. Rossier:

Hormonal regulation of (Na-K)-ATPase biosynthesis in the toad bladder. Effect of aldosterone and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine.

J. Biol. Chem. 257:10338-10343 (1982)

- Girardet, M., K. Geering, J.M. Frantes, D. Geser, B.C. Rossier, J.P. Kraehenbuhl und C. Bron:
Immunochemical evidence for a transmembrane orientation of both the (Na-K)-ATPase subunits.
Biochem. 20:6684-6691 (1981)
- Giroud, C.J.P., J. Stachenko und E.H. Venning:
Secretion of aldosterone by zona glomerulosa of rat adrenal glands incubated in vitro.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 92:154-158 (1956)
- Glynn, I.M.:
The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells.
J. Physiol. 136:148-173 (1957)
- Glynn, I.M. und S.J.D. Karlish:
The sodium pump.
Ann. Rev. Physiol. 37:13-55 (1975)
- Goldberg, I.H. und H. Rabinowitz:
Actinomycin D inhibition of deoxyribonucleic acid dependent synthesis of ribonucleic acid.
Science 136:315-316 (1962)
- Gonzalez-Serratos, H., A.V. Somlyo, G. McClellan, H. Shuman, L.M. Berrero und A.P. Somlyo:
Composition of vacuoles and sarcoplasmic reticulum in fatigued muscle: Electron microprobe analysis.
Proc. Natl. Acad. Sci. 75:1329-1333 (1978)
- Goodmann, D.B.P., F.E. Bloom, E.R. Battenberg, H. Rasmussen und W.L. Davis:
Immunofluorescent localization of cyclic AMP in toad urinary bladder: Possible intercellular transfer.
Science 188:1023-1025 (1975)
- Grim, E., A. Simonds, C. Oeljen und J. Cheng:
Inulin and mannitol distribution volumens in canine small intestinal tissues in vivo.
Am. J. Physiol. 224:186-190 (1973)
- Hall, T.A.:
The microprobe assay of chemical elements.
In: Physical techniques in biological research. (Hrsg. G. Oster)
Academic Press, London, New York, S. 157-275 (1971)
- Hall, T.A.:
Methods of quantitative analysis.
J. Microsc. Biol. Cell 22:271-281 (1975)
- Halm, D.R. und D.C. Dawson:
Aldosterone does not stimulate the Na:K-pump in isolated turtle colon.
Pflügers Arch. 403:236-239 (1985)

Hamilton, K.L. und D.C. Eaton:

Single channel recording from the amiloride-sensitive epithelial Na channel.

J. Biophys. 47:262a (1985)

Handler, J.S., A.S. Preston und J. Orloff:

Effect of the adrenal steroid hormones on the response of the toads urinary bladder to vasopressin.

J. Clin. Invest. 48:823-833 (1969)

Handler, J.S., A.S. Preston und J. Orloff:

Effect of ADH, aldosterone, ouabain and amiloride on toad bladder epithelial cells.

Am. J. Physiol. 222:1071-1074 (1972)

Harada, Y., T. Tomita, T. Watabe, H. Watanabe und E. Etoh:

Reduction of contamination in analytical electron microscopy.

SEM II:103-110 (1979)

Hartmann, F.A., H.J. Spoor und L.A. Lewis:

Sodium factor of adrenal.

Science: 89:204 (1939)

Higgins, J.T., jr, B. Gebbler und E. Frömter:

Electrical properties of amphibian urinary bladder. II. The cell potential profile in *Necturus maculosus*.

Pflügers Arch. 371:87-97 (1977)

Hill, J., N. Cortas und M. Walser:

Aldosterone action and sodium- and potassium- activated adenosine triphosphatase in toad bladder.

J. Clin. Invest. 52:185-189 (1973)

Hodson, S. und J. Marshall:

Ultracryotomy: A technique for cutting ultrathin sections of unfixed frozen biological tissues for electron microscopy.

J. Microsc. 91:105-117 (1970)

Hodson, S. und J. Marshall:

Evidence against through-section thawing whilst cutting on the ultracryotome.

J. Microsc. 95:459-466 (1972)

Hopper, G. und D.A.T. Dick:

Nonuniform distribution of sodium in the rat hepatocyte.

J. Gen. Physiol. 67:469-474 (1976)

Horster, M., H. Schmid und U. Schmidt:

Aldosterone in vitro restores nephron Na-K-ATPase of distal segments from adrenalectomized rabbits.

Pflügers Arch. 384:203-206 (1980)

Hoshiko, T. und L. Engbaek:

Microelectrode study of the frog skin potential.

In: Proc. 20th Int. Physiol. Congress, Brüssel, S. 443 (1956)

Hoshi, T. und F. Sakai:

A comparison of the electrical resistance of the surface cell membrane and cellular wall in the proximal tubule of the newt kidney. *Jap. J. Physiol.* 17:627-637 (1967)

Huf, E.G. und J.P. Wills:

Influence of some inorganic cations on active salt and water uptake by isolated frog skin.

Am. J. Physiol. 167:255-260 (1951)

Huf, E.G., J.P. Wills und M.F. Arrighi:

Electrolyte distribution and active salt uptake in frog skin.

J. Gen. Physiol. 38:867-888 (1955)

Hurwitz, J., J.J. Furth, M. Malamy und M. Alexander:

The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic synthesis. III. The inhibition of the enzymatic synthesis of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid by actinomycin D and proflavin.

Proc. Natl. Acad. Sci. 48:1222-1230 (1962)

Hviid-Larsen, E.:

Effect of amiloride, cyanide and ouabain on the active transport pathway in toad skin.

In: *Transport mechanisms in epithelia.* (Hrsg. H.H. Ussing und N.A. Thorn) Academic Press, New York, S. 131-147 (1972)

Hynie, S. und G.W.G. Sharp:

Adenylcyclase in the toad bladder.

Biochim. Biophys. Acta 230:40-51 (1970)

Imamura, A. und N. Sasaki:

The effect of desoxycorticosteroneglucoside on the sodium transport in frog skin.

Setai no Kagaku 13:73-77 (1962)

Ingram, F.D., M.J. Ingram und C.A.M. Hogben:

Quantitative electron probe analysis of soft biologic tissue for electrolytes.

J. Histochem. 20:716-722 (1972)

Ingram, F.D., M.J. Ingram und C.A.M. Hogben:

An analysis of the freeze-dried, plastic embedded electron probe specimen preparation.

In: *Microprobe analysis as applied to cells and tissues.* (Hrsg. T.A. Hall, P. Echlin und R. Kaufmann) Academic Press, London, New York, S. 119-146 (1974)

Janacek, K. und R. Rybova:

Nonpolarized frog bladder preparations. The effects of oxytocin.

Pflügers Arch. 318:294-304 (1970)

Jehl, B., R. Bauer, A. Dörge und R. Rick:

The use propane/isopentane mixtures for rapid freezing of biological specimen.

J. Microsc. 123:307-309 (1981)

Katz, A.I., A. Doucet und F. Morel:

Na-K-ATPase activity along the rabbit, rat and mouse nephron.
Am. J. Physiol. 237:114-120 (1979)

Katzin, L.I.:

The ionic permeability of frog skin as determined with the aid of radioactive indicators.

Biol. Bull. 77:402 (1939)

Katzin, L.I.:

The use of radioactive tracers in the determination of irreciprocal permeability of biological membranes.

Biol. Bull. 79:342 (1940)

Keller, A.R.:

An electron microscopic study of the bladder of the tropical toad (*Bufo marinus*).

In: A thesis. (Hrsg. Dept. Biochemical Sciences) Harvard College, Cambridge (1960)

Keller, A.R.:

A histochemical study of the toad urinary bladder.

Anat. Rec. 147:367 (1963)

Kidder, G.W., M. Cerejido und P.F. Curran:

Transient changes in electrical potential differences across frog skin.

Am. J. Physiol. 207:935-940 (1964)

Kinne, R. und R. Kirsten:

Der Einfluß von Aldosteron auf die Aktivität mitochondrialer und cytoplasmatischer Enzyme in der Rattenniere.

Pflügers Arch. 300:244-251 (1968)

Kinne, R., H. Murer, E. Kinne-Saffran, M. Thees und G. Sachs:

Sugar transport by renal plasma membrane vesicles.

J. Membrane Biol. 21:375-395 (1975)

Kirk, R.G. und G.H. Dobbs:

Freeze-fracturing in a modified cyro-ultramicrotome to prepare large intact replicas and samples for X-ray microanalysis.

Science Tools 23:28-39 (1976)

Kirk, R.G., M.A. Crenshaw und D.C. Tosteson:

Potassium content of single human red cells measured with an electron probe.

J. Cell Physiol. 84:29-36 (1974)

Kirschner, J.B.:

The effect of atropine and the curares on the active transport of sodium by the skin of *Rana esculenta*.

J. Cell Comp. Physiol. 45:89-101 (1955)

Kirsten, R. und E. Kirsten:

Redox state of pyridine nucleotides in renal response to aldosterone.

Am. J. Physiol. 223:229-232 (1972)

- Kirsten, E., R. Kirsten, A. Leaf und G.W.G. Sharp:
Increased activity of enzymes of the tricarboxylic acid cycle in response to aldosterone in the toad bladder.
Pflügers Arch. 300:213-225 (1968)
- Kirsten, E., R. Kirsten und G.W.G. Sharp:
Effects of sodium transport stimulating substances on enzyme activities in the toad bladder.
Pflügers Arch. 316:26-32 (1970)
- Knox, W.H. und A.D. Sen:
Mechanism of action of aldosterone with particular reference to (Na-K)-ATPase.
Ann. New York Acad. Sci. 242:471-488 (1974)
- Koefoed-Johnsen, V.:
The effect of g-strophantin (ouabain) on the active transport of sodium through the isolated frog skin.
Acta Physiol. Scand. 42 (145):87-93 (1957)
- Koefoed-Johnsen, V. und H.H. Ussing:
The nature of the frog skin potential.
Acta Physiol. Scand. 42:298-308 (1958)
- König, H. und A. Winkler:
Über Einschlüsse in Bakterien und ihre Veränderung im Elektronenmikroskop.
Naturwissenschaften 35:136-144 (1948)
- Krogh, A.:
Osmotic regulation in the frog (*R. esculenta*) by active absorption of chloride ions.
Scand. Arch. Physiol. 76:60-74 (1937)
- Krogh, A.:
The active absorption of ions in some freshwater animals.
Zeitschr. vergl. Physiol. 25:335-350 (1938)
- Lang, M. und I.S. Edelman:
Effects of aldosterone and vasopressin on adenyl cyclase activity of rat kidney.
Am. J. Physiol. 222:21-24 (1972)
- Lau, Y.-T., M.A. Lang und A. Essig:
Effects of antidiuretic hormone on kinetic and energetic determinants of active sodium transport in frog skin.
Biochim. Biophys. Acta 647:177-187 (1981)
- Law, P.Y. und I.S. Edelman:
Effect of aldosterone on incorporation of amino acids into renal medullary proteins.
J. Membrane Biol. 41:15-40 (1978a)
- Law, P.Y. und I.S. Edelman:
Induction of citrate synthase by aldosterone in the rat kidney.
J. Membrane Biol. 41:41-64 (1978b)

Leaf, A.:

Ion transport by the isolated bladder of the toad.
Int. Congr. Biochem. Abstr., sect. 12:4 (1955)

Leaf, A.:

Transepithelial transport and its hormonal control in toad bladder.
Biol. Chem. Exp. Pharmacol. 56:216-263 (1965)

Leaf, A., J. Anderson und L.B. Page:

Active sodium transport by the isolated toad bladder.
J. Gen. Physiol. 41:657-668 (1958)

Leaf, A. und E.F. Dempsey:

Some effects of mammalian neurohypophyseal hormones on metabolism and active transport of sodium by the isolated toad bladder.
J. Biol. Chem. 235:2160-2163 (1960)

Leaf, A. und A.D.C. Macknight:

The site of the aldosterone induced stimulation of sodium transport.
J. Steroid Biochem. 3:237-245 (1972)

LeFurgey, A. und C.C. Tisher:

Time course of vasopressin-induced formation of microvilli in granular cells of toad urinary bladder.
J. Membrane Biol. 61:13-19 (1981)

Lewis, S.A. und N.K. Wills:

Apical membrane permeability and kinetic properties of the sodium pump in rabbit urinary bladder.
J. Physiol. 341:169-184 (1983)

Li, J. H.-Y., L.P. Palmer, I.S. Edelman und B. Lindemann:

The role of sodium-channel density in the natriuretic response of the toad urinary bladder to an antidiuretic hormone.
J. Membrane Biol. 64:77-89 (1982)

Lindemann, B. und W. van Driessche:

Sodium-specific membrane channels of frog skin are pores: Current fluctuations reveal high turnover.
Science 195:292-294 (1977)

Lindley, B.D. und T. Hoshiko:

The effect of alkali metal cations and common anions on the frog skin potential.
J. Gen. Physiol. 47:749-771 (1964)

Lipson, L.C. und G.W. Sharp:

Effect of prostaglandin E_1 on sodium transport and osmotic water flow in the toad bladder.
Am. J. Physiol. 220:1046-1052 (1971)

Lipton, P. und I.S. Edelman:

Effects of aldosterone and vasopressin on electrolytes of toad bladder epithelial cells.
Am. J. Physiol. 221:733-741 (1971)

Test, J.H.:

Über einzellige Drüsen (Becherzellen) im Blasenepithel der Amphibien.
Arch. mikr. Anat. 20:147 (1887)

Löwenstein, W.R. und Y. Kanno:

Some electrical properties of a nuclear membrane examined with a microelectrode.

J. Gen. Physiol. 46:1123-1140 (1963)

Lundberg, A.:

The mechanism of establishment of secretory potentials in sublingual gland cells.

Acta Physiol. Scand. 40:35-58 (1957)

Mach, R.S., J. Fabre, A. Duckert, R. Borth und P. Ducommun:

Action clinique et metabolique de l'aldosterone (electrocortine).

Schweiz. Med. Wochenschr. 84:407-416 (1954)

Machen, T.E., D. Erlij und F.B.P. Wooding:

Permeable junctional complexes. The movement of lanthanum across rabbit gallbladder and intestine.

J. Cell Biol., 54:302-312 (1972)

Macknight, A.D.C., M.M. Civan und A. Leaf:

The sodium transport pool in toad urinary bladder epithelial cells.

J. Membrane Biol. 20:365-386 (1975)

Macknight, A.D.C., D.R. DiBona und A. Leaf:

Sodium transport across toad urinary bladder: A model "tight" epithelium.

Physiol. Rev. 60:615-715 (1980)

Macknight, A.D.C., A. Leaf und M.M. Civan:

Effects of vasopressin on the water and ionic composition of toad bladder epithelial cells.

J. Membrane Biol. 6:127-137 (1971)

Maetz, J.:

Le controle endocrinien du transport actif de sodium a travers la peau de grenouille.

In: The method of isotopic tracers applied to active ion transport.

The Saclay Conference, New York, Pergamon Press, S. 185-195 (1959)

Maetz, J., S. Jarce und F. Morel:

Action de l'aldosterone sur le transport actif de sodium de la peau de grenouille.

C.R. Acad. Sci, Paris, 247:516-518 (1958)

Mandel, L.J. und P.F. Curran:

Chloride flux via a shunt pathway in frog skin: Apparent exchange diffusion.

Biochim. Biophys. Acta 282:258-264 (1972a)

Mandel, L.J. und P.F. Curran:

Response of the frog skin to steady-state voltage clamping. I. The shunt pathway.

J. Gen. Physiol. 59:503-518 (1972b)

Martinez-Palomo, A., D. Erlij und H. Bracho:

Localization of permeability barriers in the frog skin epithelium.

J. Cell Biol. 50:277-287 (1971)

McAfee, R.D. und W. Locke:

Effects of certain steroids on bioelectrical current of frog skin.

Am. J. Physiol. 200:797-800 (1961)

McEvoy, J., G. Hollman und G. Senft:

Zur Lokalisation der Wirkung von Mineralcorticoiden auf den Natriumtransport in der Niere.

Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 247:350 (1964)

McIver, D.J.L. und A.D.C. Macknight:

Extracellular space in some isolated tissues.

J. Physiol. 239:31-49 (1974)

Mendoza, S.A., J.S. Handler und J. Orloff:

Effect of inhibitors of sodium transport on response of toad bladder to ADH and cyclic AMP.

Am. J. Physiol. 219:1440-1445 (1970)

Mills, J.W. und S.A. Ernst:

Localization of sodium pump sites in frog urinary bladder.

Biochim. Biophys. Acta 375:268-273 (1975)

Mills, J.W., S.A. Ernst und D.R. DiBona:

Localization of Na-pump sites in frog skin.

J. Cell Biol. 73:88-110 (1977)

Moore, L., D.F. Fitzpatrick, T.S. Chen und E.J. Landon:

Calcium pump activity of the renal plasma membrane and renal microsomes.

Biochim. Biophys. Acta 345:405-418 (1974)

Morel, F. und F. Bastide:

Action de l'ocytocine sur la composante active du transport de sodium par la peau de grenouille.

Biochim. Biophys. Acta 94:609-611 (1965)

Moreno, J.H., I.L. Reisin, E. Rodriguez-Boulan, C.A. Rotunno und M. Cereijido:

Barriers to sodium movement across frog skin.

J. Membrane Biol. 11:99-115 (1973)

Nagel, W.:

The intracellular electrical potential profile of the frog skin epithelium.

Pflügers Arch. 365:135-143 (1976)

Nagel, W. und J. Crabbé:

Mechanism of action of aldosterone on active sodium transport across toad skin.

Pflügers Arch. 385:181-187 (1980)

Nagel, W. und A. Dörge:

A study of the different sodium compartments and the transepithelial sodium fluxes of the frog skin with the use of ouabain.

Pflügers Arch. 324:267-278 (1971)

Nielsen, R.:

Effect of ouabain, amiloride and antidiuretic hormone on the sodium transport pool in isolated epithelia from frog skin (*Rana temporaria*).

J. Membrane Biol. 65:221-226 (1982)

Notochin, J.V., K. Janacek und R. Rybova:

The swelling of frog bladder cells produced by oxytocin.

J. Endocr. 33:171-177 (1965)

Omachi, R.S., D.E. Robbie, J.S. Handler und J. Orloff:

Effects of ADH and other agents on cyclic AMP accumulation in toad bladder epithelium.

Am. J. Physiol. 226:1152-1157 (1974)

Orloff, J. und J.S. Handler:

The role of adenosine, 3, 5-phosphate in the action of antidiuretic hormone.

Am. J. Med. 42:757-768 (1967)

Orloff, J., J.S. Handler und J.S. Stoff:

Permissive effect of aldosterone on the action of vasopressin.

In: Transport mechanisms in epithelia (Hrsg. H.H. Ussing und N.A. Thorn) Academic Press, New York, S. 205-213 (1973)

Palmer, L.G., I.S. Edelman und B. Lindemann:

Current-voltage analysis of apical sodium transport in toad urinary bladder: Effects of inhibitors of transport and metabolism.

J. Membrane Biol. 57:59-71 (1980)

Palmer, L.G., J. H.-Y. Li, B. Lindemann und I.S. Edelman:

Aldosterone control of the density of sodium channels in the toad urinary bladder.

J. Membrane Biol. 64:91-102 (1982)

Palmer, L.G. und N. Speez:

Stimulation of apical Na permeability and basolateral Na pump of toad urinary bladder by aldosterone.

Am. J. Physiol. 250:273-281 (1986)

Petty, K., J. Kokko und D. Marver:

Secondary effect of aldosterone on Na:K-ATPase activity in the rabbit cortical collecting tubule.

J. Clin. Invest. 68:1514-1521 (1981)

- Porter, G.A. und I.S. Edelman:
The action of aldosterone and related corticosteroids on sodium transport across the toad bladder.
J. Clin. Invest. 43:611-620 (1964)
- Porter, G.A., R. Bogoroch und I.S. Edelman:
On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport: The role of RNA synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. 52:1326-1333 (1964)
- Rawlins, F., L. Mateu, F. Fragachan und G. Whitembury:
Isolated toad skin epithelium: Transport characteristics.
Pflügers Arch. 316:64-80 (1970)
- Reichstein, T.:
Chemical structure of corticosterone.
Helv. Chim. Acta 20:953-955 (1937)
- Reimer, L.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967)
- Rick, R., A. Dörge und W. Nagel:
Influx and efflux of sodium at the outer surface of frog skin.
J. Membrane Biol. 22:183-196 (1975)
- Rick, R., A. Dörge, A.D.C. Macknight, A. Leaf und K. Thureau:
Electron microprobe analysis of the different epithelial cells of toad urinary bladder.
J. Membrane Biol. 39:257-271 (1978a)
- Rick, R., A. Dörge, E.v. Arnim und K. Thureau:
Electron microprobe analysis of frog skin epithelium: Evidence for a syncytial sodium transport compartment.
J. Membrane Biol. 39:313-331 (1978b)
- Rick, R., A. Dörge, R. Bauer, K. Gehring und K. Thureau:
Quantification of electrolytes in freeze-dried cryosections by electron microprobe analysis.
SEM II:619-626 (1979)
- Rick, R., A. Dörge, U. Katz, R. R. Bauer und K. Thureau:
The osmotic behaviour of toad skin epithelium (*Bufo viridis*). An electron microprobe analysis.
Pflügers Arch. 385:1-10 (1980)
- Rick, R., A. Dörge und K. Thureau:
Quantitative analysis of electrolytes in frozen dried sections.
J. Microsc. 125:239-247 (1982)
- Rick, R., C. Roloff, A. Dörge, F.X. Beck und K. Thureau:
Intracellular electrolyte concentrations in the frog skin epithelium: Effect of vasopressin and dependence on the Na concentration in the bathing media.
J. Membrane Biol. 78:129-145 (1984)

Robison, W.L., L. Van Middlesworth und D. Davis:
Calcium, iodine and phosphorus distribution in human thyroid glands
by electron probe microanalysis.
J. Clin. Endocr. 32:786-795 (1971)

Saito, J. und A. Essig:
Effect of aldosterone on active and passive conductance and E_{Na} in
the toad bladder.
J. Membrane Biol. 13:1-18 (1973)

Sariban-Sohraby, S., M. Burg, W.P. Wiesmann, P.K. Chiang und J.P.
Johnson:
Methylation increases sodium transport into A6 apical membrane
vesicles:
Possible mode of aldosterone action.
Science 225:745-746 (1984)

Saubermann, A.J., W.D. Riley und R. Beuwkes:
Cutting work in thick section cryomicrotomy.
J. Microsc. 111:39-49 (1977)

Sawyer, W.H.:
The hormonal control of water and electrolyte metabolism with special
reference to amphibia.
Mem. Soc. Endocrinol. 5:44-59 (1956)

Schatzmann, J.H.:
Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und
Natriumtransport durch die Erythrocytenmembran.
Helv. Physiol. Acta 11:346-354 (1953)

Schiefferdecker, P.:
Zur Kenntnis des Baues der Schleimdrüsen.
Arch. mikr. Anat. 23:382 (1884)

Schmidt, U. und U.C. Dubach:
Na-K stimulated adenosine-triphosphatase: Intracellular localization
within the proximal tubule of the rat nephron.
Pflügers Arch. 330:265-270 (1971)

Schmidt, V., J. Schmid, H. Schmid, und U.C. Dubach:
Sodium and potassium activated ATPase: A possible target of
aldosterone.
J. Clin. Invest. 55:655-660 (1975)

Schultz, S.G., R.A. Frizzell und H.N. Nellans:
Ion transport by mammalian small intestine.
Ann. Rev. Physiol. 36:51-92 (1974)

Scott, W.N., V.S. Sapirstein und M.J. Yoder:
Partition of tissue functions in epithelia: Localization of enzymes
in "mitochondria-rich" cells of toad urinary bladder.
Science 184:797-800 (1974)

Sharp, G.W.G und A. Leaf:

Biological action of aldosterone in vitro.

Nature 202:1185-1188 (1964a)

Sharp, G.W.G. und A. Leaf:

The central role of pyruvate in the stimulation of sodium transport by aldosterone.

Proc. Nat. Acad. Sci. 52:1114-1121 (1964b)

Sharp, G.W.G. und A. Leaf:

Mechanism of action of aldosterone.

Physiol. Rev. 46:593-632 (1966)

Siebert, G. und H. Langendorf:

Ionenhaushalt im Zellkern.

Naturwissenschaften 57:119-124 (1970)

Simpson, S.A. und J.F. Tait:

Quantitative method for bioassay of effect of adrenal cortical steroids on mineral metabolism.

Endocrin. 50:150-161 (1952)

Simpson, S.A., J.F. Tait und I.E. Bush:

Secretion of salt-retaining hormone by mammalian adrenal cortex.

Lancet 2:226-228 (1952)

Simpson, S.A., J.F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. v. Euw und T. Reichstein:

Isolierung eines neuen kristallisierten Hormons aus Nebennieren mit besonders hoher Wirksamkeit auf den Mineralstoffwechsel.

Experientia 9:333-335 (1953)

Skorecki, K.L., A.S. Verkman, C.Y. Jung und D.A. Ausiello:

Evidence for vasopressin activation of adenylate cyclase by subunit dissociation.

Am. J. Physiol. 250:115-123 (1986)

Skou, J.C.:

The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves.

Biochim. Biophys. Acta 23:394-401 (1957)

Skou, J.C.:

Further investigations on a Mg+Na-activated adenosinetriphosphatase possibly related to the active linked transport of Na and K across the nerve membrane.

Biochim. Biophys. Acta 42:6-23 (1960)

Skou, J.C.:

Enzymatic basis for active transport of Na and K across cell membranes.

Physiol. Rev. 45:596-617 (1965)

Spooner, P.M. und I.S. Edelman:
Further studies on the effect of aldosterone on electrical resistance
of toad bladder.

Biochim. Biophys. Acta 406:304-314 (1975)

Staehelin, L.A.:
Structure and function of intercellular junctions.
Int. Rev. Cytol. 39:191-283 (1974)

Steiger, M. und T. Reichstein:
Chemical structure of corticosterone.
Nature 141:202-204 (1938)

Stephenson, J.L.:
Ice cristal growth during the rapid freezing of tissues.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2/4:45-52 (1956)

Stirling, C.E.:
Radioautographic localization of sodium pump sites in rabbit
intestine.
J. Cell Biol. 53:704-714 (1972)

Stirling, C.E.:
High-resolution autoradiography of 3H-ouabain binding in salt
transport epithelia.
J. Microsc. 106:145-158 (1976)

Stoff, J.S., J.S. Handler und J. Orloff:
The effect of aldosterone on the accumulation of adenosine 3, 5-
cyclic monophosphate in toad bladder epithelial cells in response to
vasopressin and theophylline.
Proc. Natl. Acad. Sci. 69:805-808 (1972)

Stoff, J.S., J.S. Handler, A.S. Preston und J. Orloff:
The effect of aldosterone on cyclic nucleotide phosphodiesterase
activity in urinary bladder.
Life Sci. 13:545-552 (1973)

Sutfin, L.V.:
An ultra-high vacuum SEM for microanalysis of ultrastructure of thin
specimen.
Proc. 11th Ann. Conf. Microbeam, Analysis Society, Miami Beach,
Florida, USA, S. 66A-E (1976)

Tait, J.F., S.A.S. Tait, B. Little und K.R. Laumas:
The disappearance of 7-H³-d-Aldosterone in the plasma of normal
subjects.
J. Clin. Invest. 40:72-80 (1961)

Thomas, R.C.:
Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells.
Physiol. Rev. 52:563-594 (1972)

Tisher, C.C. und W.E. Yarger:

Lanthanum permeability of the tight junction (zonule occludens) in the renal tubule of the rat.

Kidney Int. 3:238-250 (1973)

Urakabe, S., J.S. Handler und J. Orloff:

Effect of hypertonicity on permeability properties of toad bladder.

Am. J. Physiol. 210:1179-1187 (1970)

Ussing, H.H.:

The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies.

Acta Physiol. Scand. 17:1-37 (1949)

Ussing, H.H., D. Erlij und U. Lassen:

Transport pathways in biological membranes.

Ann. Rev. Physiol. 36:17-49 (1974)

Ussing, H.H. und E. Windhager:

Nature of shunt path and active sodium transport path through frog skin epithelium.

Acta Physiol. Scand. 61:484-504 (1964)

Ussing, H.H. und K. Zehran:

Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.

Acta Physiol. Scand. 23:110-127 (1951)

Vander, A.J., R.L. Malvin, W.S. Wilde, J. Lapides, L.P. Sullivan und V.M. McMurray:

Effects of adrenalectomy and aldosterone on proximal and distal tubular sodium reabsorption.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 99:323-325 (1958)

Van Venrooij, G.E.P.M., A.M.H.J. Aertsen und W.M.A. Hax:

Freeze-etching: Freezing velocity and crystal size at different locations in samples.

Cryobiology 12:46-61 (1975)

Voûté, C.L., J. Thummel und M. Brenner:

Aldosterone effect in the epithelium of the frog skin. A new story about an old enzyme.

Experientia 30:684 (1974)

Wade, J.B., J.P. Revel und V.A. Discala:

Effect of osmotic gradients on intercellular junctions of the toad bladder.

Am. J. Physiol. 224:407-415 (1973)

Walton, K.G., R.J. DeLorenzo, P.F. Curran und P. Greengard:

Regulation of protein phosphorylation and sodium transport in toad bladder.

J. Gen. Physiol. 65:153-177 (1975)

Whittam, R.:

Potassium movements and ATP in human red cells.
J. Physiol. 140:479-497 (1958)

Whittembury, G.:

Electrical potential profile of the toad skin epithelium.
J. Gen. Physiol. 47:795-808 (1964)

Williamson, H.E.:

Mechanisms of the antinatriuretic action of aldosterone.
Biochem. Pharmacol. 12:1449-1450 (1963)

Wills, N.K. und S.A. Lewis:

Intracellular Na activity as a function of Na transport across a tight epithelium.
Biophys. J. 30:181-186 (1980)

Wolff, D. und A. Essig:

Kinetics of bidirectional active sodium fluxes in the toad bladder.
Biochim. Biophys. Acta 468:271-283 (1977)

Yarmolinsky, M.B. und G.L. De LaHaba:

Inhibition by puromycin of amino acid incorporation into protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. 45:1721-1729 (1959)

Zylber, E.A., C.A. Rotunno und M. Cereijido:

Ion and water balance in isolated epithelial cells of the abdominal skin of the frog *Leptodactylus ocellatus*.
J. Membrane Biol. 13:199-216 (1973)

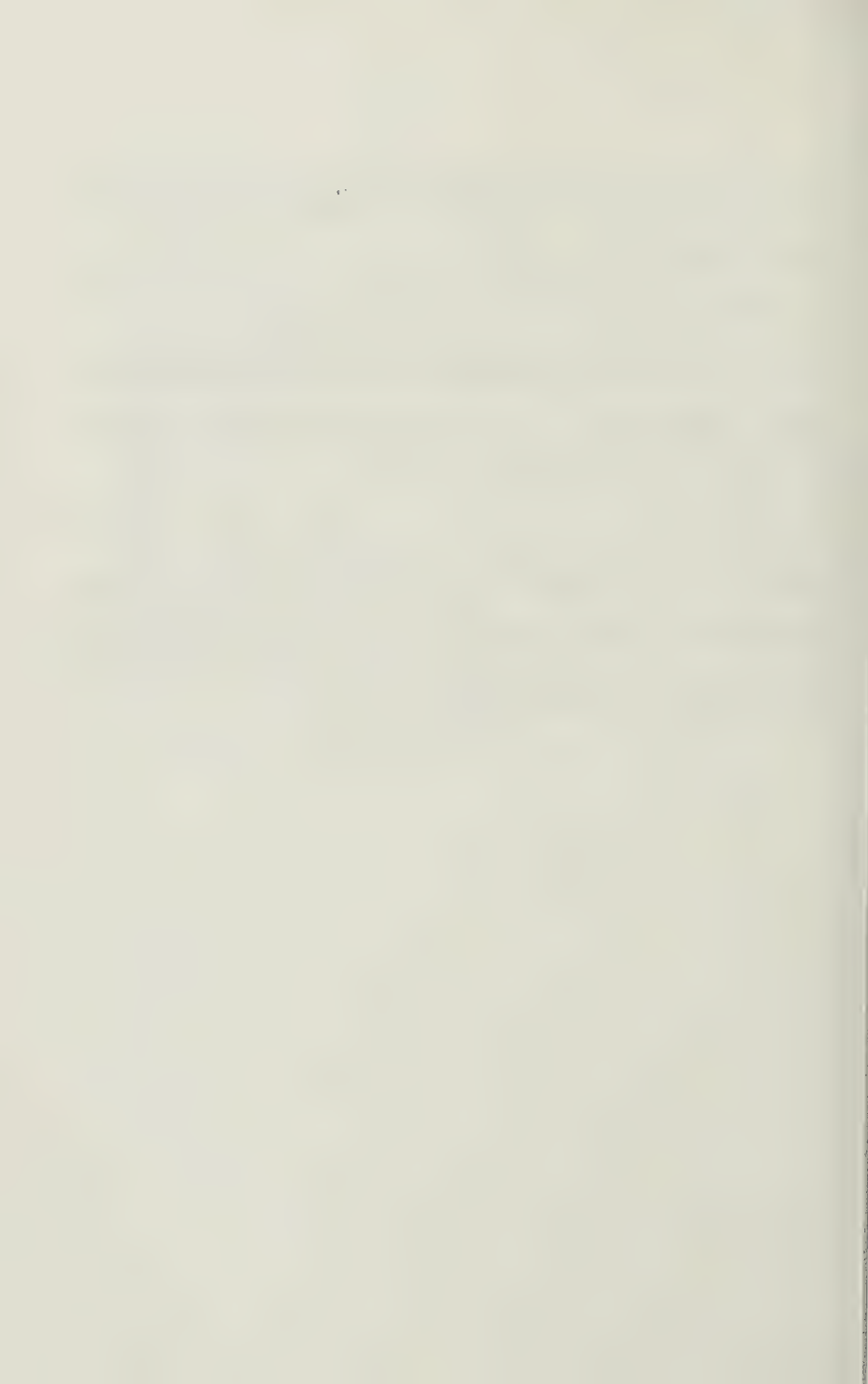
Ich danke den Mitarbeitern des Physiologischen Institutes der Ludwig-Maximilians-Universität, insbesondere der Forschungsgruppe des Labors Dörge, für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt Frau B. Wörndl für Ihre gewissenhafte Einführung in die vielen technischen Arbeiten und Ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. R. Rick und Herrn Prof. Dr. A. Dörge möchte ich für die Vergabe der Themenstellung, ihre freundliche Betreuung der Arbeit und ihre stete Bereitschaft zur Diskussion danken.

Herrn Prof. Dr. K. Thureau danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. G. Neuweiler vom Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität möchte ich für sein Interesse und für seine Bereitschaft danken, diese Arbeit vor der Biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu vertreten.



Lebenslauf

- 7.1.1955 geboren in Menden/Sauerland als Tochter der Eltern Werner und Marlies Spancken, geb. Kissing
- 1961 - 1965 Besuch der Josephschule in Menden
- 1965 - 1973 Besuch des neusprachlichen Mädchengymnasiums in Menden
- 17.5.1973 Reifeprüfung
- 1973 - 1976 Pädagogische Hochschule in Dortmund
- 19.10.76 1. Staatsprüfung für das Lehramt an der Grund- und Hauptschule mit den Fächern Biologie/Mathematik/Kunst
- 1976 - 1980 Ruhr-Universität in Bochum
- 25.4.1980 1. Staatsprüfung für das Lehramt für die Sekundarstufe II mit den Fächern Biologie/Erdkunde
- 1980 - 1982 Vorbereitungsdienst für das Lehramt für die Sekundarstufe II mit dem Schwerpunkt Gymnasium im Gesamtseminar Arnsberg, Ausbildungsgruppe Dortmund
- 15.9.1982 2. Staatsprüfung für das Lehramt für die Sekundarstufe II mit den Fächern Biologie/Erdkunde
- 1982 - 1984 Mitarbeiterin an einem Forschungsprojekt der Deutschen Forschungsgemeinschaft - Physiologisches Institut der LMU-München, Lehrstuhl Prof. Thureau
- seit 19.8.1984 Assessorin des Lehramts am Bertha-von-Suttner Gymnasium in Oberhausen

1910-1911

1. The first of the year was a very dry one, and the crops were much affected.

2. The second of the year was a very wet one, and the crops were much affected.

3. The third of the year was a very dry one, and the crops were much affected.

4. The fourth of the year was a very wet one, and the crops were much affected.

5. The fifth of the year was a very dry one, and the crops were much affected.

6. The sixth of the year was a very wet one, and the crops were much affected.

7. The seventh of the year was a very dry one, and the crops were much affected.

8. The eighth of the year was a very wet one, and the crops were much affected.

9. The ninth of the year was a very dry one, and the crops were much affected.

10. The tenth of the year was a very wet one, and the crops were much affected.

11. The eleventh of the year was a very dry one, and the crops were much affected.

12. The twelfth of the year was a very wet one, and the crops were much affected.

